

Aus dem Institut für Virusdiagnostik  
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,  
Insel Riems  
Institutsleiter: Priv.-Doz. Dr. M. Beer

Angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. C. H. Grund

---

**Untersuchungen an Ringeltauben (*Columba palumbus*)  
zum Nachweis von Infektionen mit dem  
aviären Paramyxovirus 1 (APMV-1)**

---

Inaugural Dissertation  
zur  
Erlangung der tiermedizinischen  
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Eva Huthmann  
aus Düsseldorf

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Grund  
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Tag der Promotion: 17.Juli 2009

**Meiner Familie**



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Kapitel</b>		<b>Seite</b>
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>TAXONOMIE DER PARAMYXOVIREN</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>AVIÄRE PARAMYXOVIREN</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1</b>	Virusmorphologie, Virusbestandteile und ihre Funktion	<b>4</b>
<b>2.2.2</b>	Tenazität von aviären Paramyxoviren	<b>6</b>
<b>2.2.3</b>	Serotypen und Wirtsspektrum von aviären Paramyxoviren	<b>8</b>
<b>2.3</b>	<b>DAS AVIÄRE PARAMYXOVIRUS-1</b>	<b>10</b>
<b>2.3.1</b>	Einteilung des APMV-1 in Stämme, Genotypen und Pathotypen	<b>10</b>
<b>2.3.2</b>	Bedeutung und Geschichte von APMV-1	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>AMPV-1 BEI TAUBEN (COLUMBIDAE)</b>	<b>13</b>
<b>2.4.1</b>	Entdeckung und Ausbreitung	<b>13</b>
<b>2.4.2</b>	Einordnung und Vorkommen von APMV Isolaten bei Tauben	<b>15</b>
<b>2.4.3</b>	Die PPMV-1 Infektion bei der Taube	<b>17</b>
<b>2.4.3.1</b>	Infektionsverlauf, Erregertropismus und Persistenz	<b>17</b>
<b>2.4.3.2</b>	Klinisches Bild	<b>18</b>
<b>2.4.3.3</b>	Pathologisches Bild	<b>19</b>
<b>2.4.3.4</b>	Bedeutung von APMV-1 Infektionen der Taube für Geflügel	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>GESETZLICHE REGELUNGEN</b>	<b>23</b>

<b>2.6</b>	<b>DIAGNOSTISCHE MÖGLICHKEITEN</b>	<b>25</b>
2.6.1	Virusnachweis	26
2.6.2	Antikörpernachweis	27
2.6.2.1	Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	27
2.6.2.2	Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)	27
2.6.2.3	Westernblot (WB)	28
<b>2.7</b>	<b>TAUBENVÖGEL (COLUMBIFORMAE)</b>	<b>28</b>
2.7.1	Wildtauben in Deutschland	29
2.7.1.1	Verwilderte Haustauben ( <i>Columba livia forma urbana</i> )	29
2.7.1.2	Ringeltauben ( <i>Columba palumbus</i> )	30
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>ORGANISATION DER PROBENENTNAHME</b>	<b>33</b>
3.1.1	Jagdgebiete	33
3.1.2	Untersuchungsmaterial	35
3.1.3	Altersschätzung	35
<b>3.2</b>	<b>MATERIALIEN UND PUFFER</b>	<b>37</b>
3.2.1	Materialien für die PCR	37
3.2.1.1	M PCR	38
3.2.1.2	NP PCR	39
3.2.2	Materialien für den ELISA	40
3.2.3	Materialien für die SDS Page	41
3.2.4	Materialien für den Westernblot	43
3.2.5	Materialien zum Färben eines Polyacrylamidgels	45
3.2.6	Materialien für den Hämagglutinationshemmungstest	45
<b>3.3</b>	<b>UNTERSUCHUNGSMETHODEN</b>	<b>47</b>
3.3.1	Nachweis von Virusgenom – PCR	47
3.3.1.1	Aufbereitung des Organmaterials	47
3.3.1.2	M-Gen-spezifische RRT-PCR	47
3.3.1.3	NP-Gen spezifische RRT-PCR	49

<b>3.3.2</b>	Nachweis von virusspezifischen Antikörpern	<b>50</b>
<b>3.3.2.1</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	<b>50</b>
<b>3.3.2.2</b>	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese	<b>51</b>
<b>3.3.2.3</b>	Färbung eines Polyacrylamidgels	<b>51</b>
<b>3.3.2.4</b>	Westernblot (WB)	<b>52</b>
<b>3.3.2.5</b>	Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	<b>53</b>
<b>3.4.</b>	<b>STATISTISCHE BEWERTUNG</b>	<b>55</b>
<b>3.4.1</b>	Signifikanz	<b>55</b>
<b>3.4.2</b>	Sensivität und Spezifität	<b>55</b>
<b>3.4.3</b>	ROC-Analyse	<b>55</b>
<b>3.4.4</b>	Konfidenzintervall	<b>57</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>SEKTION</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>VIROLOGISCHER NACHWEIS – REAL TIME PCR</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>SEROLOGISCHER NACHWEIS</b>	<b>60</b>
<b>4.3.1</b>	Hämagglutinationshemmungstest	<b>60</b>
<b>4.3.2</b>	ELISA zur Untersuchung von Ringeltauben auf APMV-1	<b>61</b>
<b>4.3.3</b>	SDS-Page und Westernblot	<b>66</b>
<b>4.3.3.1</b>	Darstellung von Virusproteinen nach Auftrennung in der SDS-PAGE	<b>66</b>
<b>4.3.3.2</b>	Kreuzreaktionen anderer APMV-Stämme mit APMV-1	<b>70</b>
<b>4.3.3.3</b>	Titration des definiert positiven Taubenserums	<b>73</b>
<b>4.3.3.4</b>	Untersuchung der Ringeltaubenserum im Westernblot	<b>75</b>
<b>4.3.4</b>	Vergleich der Ergebnisse des Westernblots und des ELISA	<b>80</b>
<b>4.3.4.1</b>	Ermittlung der analytischen Sensitivität des ELISA und des Westernblots	<b>85</b>
<b>4.3.5</b>	HAH mit den Antigenen APMV-2-9	<b>88</b>
<b>4.3.6</b>	Vergleich aller serologischen Ergebnisse	<b>90</b>

<b>4.4.</b>	<b>PRÄVALENZSCHÄTZUNG VON APMV BEI RINGELTAUBEN</b>	<b>92</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>93</b>
<b>5.1</b>	<b>GRUND UND ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>93</b>
<b>5.2</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER RINGELTAUBEN</b>	<b>93</b>
<b>5.2.1</b>	Probennahme	<b>93</b>
<b>5.2.2</b>	Virologische Nachweisverfahren	<b>96</b>
<b>5.2.3</b>	Serologische Nachweisverfahren	<b>98</b>
<b>5.3</b>	<b>EPIDEMIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER RINGELTAUBEN FÜR APMV</b>	<b>105</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>115</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>131</b>
<b>9.1</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>131</b>
<b>9.2</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>132</b>
<b>9.3</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>133</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>135</b>
<b>11.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>137</b>



## 1. Einleitung

Aviäre Paramyxoviren sind mit insgesamt neun Serotypen weltweit verbreitet. Der Serotyp-1 (APMV-1) erlangt hierbei die größte Bedeutung, da er bei Hausgeflügel und dort vor allem bei Hühnern und Puten eine hochkontagiöse und verlustreiche Erkrankung, die Newcastle Disease (ND) oder atypische Geflügelpest auslösen kann (ALEXANDER, 2008). Unter Tauben kursiert die besondere Variante P des APMV-1, der als Taubentyp (PPMV-1) bezeichnete wird. Tauben (*Columba livia*) können neben dem PPMV-1 auch andere APMV-1 Stämme beherbergen, darunter velogene APMV-1 Stämme, ohne unbedingt selbst zu erkranken (WERNER et al., 1999; de OLIVEIRA et al., 2007). Damit kann Tauben eine zu beachtende Bedeutung für die Erregerepidemiologie von ND zukommen. Eine Übertragung von PPMV-1 auf Hühner ist mehrfach beschrieben worden. In der Vergangenheit kam es dadurch schon zum Teil zu erheblichen Ausbrüchen. Untersuchungen an domestizierten Tauben (*Columba livia varia domestica*) und der verwilderten Form den „Stadttauben“ (*Columba livia varia urbana*), belegen eine weltweite Verbreitung von APMV-1 bei dieser Spezies (ALEXANDER et al., 1985a). In Deutschland wurden bereits APMV-1 und PPMV-1 aus dieser Taubenart isoliert, sowie serologische Nachweise erbracht. Dabei scheint die Variante PPMV-1 endemisch vorzukommen (HLINAK et al., 1998, WERNER et al., 1999).

Aus anderen Ländern wie Italien und Nordamerika liegen auch für einige Wildtaubenarten Berichte über APMV-1 Infektionen vor (TERREGINO et al., 2003; KIM et al., 2008). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass auch Wildtauben eine epidemiologische Rolle im APMV-1- Infektionsgeschehen tragen können. In Deutschland kommen vier Wildtaubenarten vor, von denen die Ringeltaube (*Columba palumbus*) am häufigsten anzutreffen ist. Ihren Lebensraum stellen auf Grund des Nahrungsangebotes vor allem landwirtschaftlich genutzten Flächen dar. Dadurch ist prinzipiell ein Kontakt zwischen kommerziell gehaltenem Geflügel und Ringeltauben möglich. Das Teilzugverhalten der Ringeltauben begünstigt darüber hinaus potentiell eine weite Verbreitung von Krankheitserregern durch diese Spezies. Eine generelle Empfänglichkeit für APMV-1 wurde bei Ringeltauben experimentell

bewiesen (PLACIDI und SANTUCCI, 1954), jedoch ist speziell bei dieser Spezies wenig über APMV-1 Infektionen bekannt. In Deutschland wurden noch keine Untersuchungen zum Vorkommen von APMV-Infektionen bei Wildtauben durchgeführt.

Ein Einblick in die mögliche Verbreitung von APMV-1 Infektionen bei Ringeltauben sollte in dieser Arbeit anhand einer Stichprobe dieser Spezies erhalten werden, die bei der Jagd erlegt wurde. Das Gebiet für die Herkunft der Proben wurde in Nordrhein Westfalen gewählt, dem Bundesland mit der höchsten Populationsdichte an Ringeltauben (DJV, 2005). In dem gewählten Jagdgebiet grenzen Städte und landwirtschaftlich genutzte Flächen aneinander, wodurch ein Kontakt von Ringeltauben sowohl zur Stadttaubenpopulation als auch zum Wirtschaftsgeflügel möglich ist. Bei der Untersuchung der Ringeltauben sollten Serumproben dazu dienen, einen generellen Einblick in den Infektionsstatus von APMV-1 Infektionen der Ringeltauben zu bekommen. Desweiteren sollten Gewebeproben entnommen werden. Deren Untersuchung sollte eine Aussage über das aktuelle Infektionsgeschehen, sowie gegebenenfalls eine Viruscharakterisierung ermöglichen. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen erwarten, eine mögliche epidemiologische Bedeutung von Wildtauben bei der Verbreitung von APMV-1 besser einschätzen zu können.

## 2. LITERATUR

### 2.1 TAXONOMIE DER PARAMYXOVIREN

Die Familie Paramyxoviridae gehört zu der Ordnung Mononegavirales, welche Viren mit nicht-segmentierter, einzelsträngiger RNA negativer Polarität umfasst. Diese Familie lässt sich in die Subfamilien Paramyxovirinae und Pneumovirinae unterteilen (Abb. 1). In der Subfamilie Paramyxovirinae wiederum werden fünf Genera zusammen gefasst. Hier wird das aviäre Paramyxovirus (APMV) in das Genus Avulavirus (Avian Rubula virus) eingeordnet (MAYO, 2002), welches erst vor kurzem vom Genus Rubulavirus abgespalten wurde. Die Spezies aviäres Paramyxovirus lässt sich schließlich in 9 Subspezies unterteilen (ALEXANDER und SENNE, 2008).

<b>ORDNUNG:</b>	> <i>Mononegavirales</i>	
<b>FAMILIE:</b>	> <i>Paramyxoviridae</i>	<b>Subfamilien:</b> 1) Paramyxovirinae 2) Pneumovirinae
<b>SUBFAMILIE:</b>	> <i>Paramyxovirinae</i>	<b>Genera:</b> 1) Rubulavirus 2) Avulavirus 3) Respirovirus 4) Henipavirus 5) Morbilivirus
<b>GENUS:</b>	> <i>Avulavirus</i>	
<b>SPEZIES:</b>	> <i>aviäres Paramyxovirus</i>	<b>Subspezies:</b> 1) APMV-1 (ND) 2-9) APMV-2...9

**Abb 1:**  
**Taxonomische Stellung aviärer Paramyxoviren**

Die Einteilung in die Familie der Paramyxoviren erfolgt über die Anwesenheit des F Proteins, welches bei neutralem pH zur Zellfusion führt. Für die Einteilung in die einzelnen Genera ist die Anwesenheit (Respiro-, Rubula- und Avulaviren), bzw. die Abwesenheit (Morbilli- und Henipaviren) von Neuraminidaseaktivität von Bedeutung (LAMB und PARKS, 2007). Alle Spezies des Genus Avulavirus besitzen Hämagglutinin- und Neuraminidaseaktivität und allen fehlt der offene Leserahmen für das C Protein (FAUQUET und MAYO, 2005).

## 2.2 AVIÄRE PARAMYXOVIREN

### 2.2.1 Virusmorphologie, Virusbestandteile und ihre Funktion

Elektronenmikroskopisch erscheinen Paramyxoviren meist in ihrer charakteristischen sphärischen Form, aber auch pleomorphe und filamentöse Partikel treten auf. Der Durchmesser beträgt 100 bis 500 nm (YUSSOF und TAN, 2001). Die Viren besitzen eine doppelschichtige Lipidmembran, die von der Wirtszelle stammt. Sie enthält zwei transmembrane Glykoproteine, das Hämagglutinin–Neuraminidase-Protein (**HN**) und das Fusions-Protein (**F**) (Abb. 2). Diese ragen als 8 bis 12 nm lange Projektionen, sogenannte „spikes“, aus der Membran.

Mit Hilfe des HN-Proteins kann das Virus an hyalinhaltige Rezeptoren der Wirtszelle binden. Das F-Protein bewirkt im Anschluss die Fusion der viralen mit der zellulären Membran und das Einschleusen des viralen Nukleoproteinkomplexes in die Wirtszelle (ALEXANDER und SENNE, 2008). Das HN-Protein bindet auch an Strukturen der Oberfläche von Erythrozyten und ist somit in der Lage, diese miteinander zu vernetzen. Diese Reaktion kann durch spezifische Antikörper verhindert werden und wird in der in vitro Diagnostik im Hämagglutinations- bzw Hämagglutinationshemmungstest genutzt, um APMV zu diagnostizieren und zu typisieren. Eine zweite Funktion des HN-Proteins ist bedingt durch seine Neuraminidaseaktivität. Diese erlaubt eine Abspaltung des Virus von der Wirtszelle, was vermutlich für die Freisetzung neuer Virionen von Bedeutung ist (IORIO et al., 2001). Ferner unterstützt das HN-Protein das F-Protein bei seiner Funktion (SERGEL et al., 1993; DENG et al., 1995).

Das F-Protein liegt zunächst als inaktives Vorläuferprotein (F<sub>0</sub>) vor. Dieses wird erst durch Proteasen der Zielzelle in F<sub>1</sub> (Aminosäure 117–553) und F<sub>2</sub> (Aminosäure 1-116) die noch über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben gespalten, und somit aktiviert (NAGAI et al., 1976; ROTT und KLENK, 1988). Hierbei wird im aminoterminalen Ende des F<sub>1</sub> ein hydrophober Bereich, das sogenannte Fusionspeptid (Aminosäure 117-142) zugänglich, das die Membranfusion bewirkt. (MODROW und FALKE, 2003; NAGAI et al., 1976). Bei in vitro Versuchen mit Zellen konnte gezeigt werden, dass einige Virusstämme für die Spaltung ihrer F<sub>0</sub>-Proteine und damit die anschließende Fähigkeit zur Infektion von Zellen, Trypsin oder Trypsin-ähnliche Enzyme benötigen. Andere sind von ihnen unabhängig und können verschiedenste zelluläre Proteasen nutzen. Virulente Virustypen die trypsinunabhängig sind, können sich demnach in unterschiedlichen Gewebearten verbreiten. Demgegenüber bleibt die Infektion mit Virustypen, die trypsinähnliche Enzyme für ihre Aktivierung benötigen, auf den Magen-Darm- und Respirationstrakt beschränkt (ROTT, 1979; OGASWARA et al., 1992).

Da die Spaltstelle des F<sub>0</sub> Proteins in ihrer Aktivierbarkeit variiert, was sich auch auf molekularer Ebene widerspiegelt, kann hierüber eine Aussage über die Virulenz eines Virustypes getroffen werden (COLLINS et al., 1993; OIE 2008). Die virulenten APMV-1 Stämme weisen am C-terminalen Ende der F<sub>2</sub>-Untereinheit die Sequenz 112-R/K RQ K/R R-116 (polybasische Aminosäurenabfolge) und Phenylalanin am N-terminalen Ende der F<sub>1</sub>-Untereinheit auf. Die nichtvirulenten Virusvarianten haben demgegenüber meist eine monobasische Aminosäurenabfolge mit der Sequenz 112-G/E K/R Q G/E R-116 am C-terminalen Ende der F<sub>2</sub>-Untereinheit und weisen Lysin am N-terminalen Ende der F<sub>1</sub>-Untereinheit auf (OIE, 2008).

Das nichtglykolisierte Matrixprotein (**M**) ist der Virushülle innen angelagert und interagiert mit dieser. Somit verleiht es ihr Stabilität. Von großer Bedeutung ist dieses Protein auch bei der Bildung von Viruspartikeln und bei der Verpackung von Virus-RNA bei der Morphogenese sowie dem Virusassembly (YUSSOF und TAN, 2001). Virushülle und Matrixprotein umgeben zusammen das Nukleokapsid.

Elektronenmikroskopisch stellt sich dieses bei Negativkontrastierung als gewundener, fischgrätenähnlicher Strang dar. Das Nukleoprotein (**NP**) umgibt als linksdrehende Helix den RNA-Strang, welcher in einem zentralen Kanal von etwa 5 nm Durchmesser liegt (SCHEID, 1987). Die RNA ist ca 15.186 Nucleotide (15,2 kb)

lang und kodiert von 3` in 5` Richtung für die sechs Proteine in der Reihenfolge 3`-NP-P-M-F-HN-L-5` (ALEXANDER und SENNE, 2008). Das NP-Protein dient unter anderem zum Schutz der RNA vor zelleigenen RNAsen (MODROW und FALKE, 2003). Außerdem muss es die RNA im Transkriptionskomplex, den es zusammen mit dem Phosphprotein (**P**) und dem Polymeraseprotein (**L**) bildet, für dessen Funktionalität umschließen (HORIKAMI et al., 1992). Der Transkriptionskomplex dient der Translation und Transkription der viralen RNA. Das L-Protein erfüllt dabei die Funktion einer RNA abhängigen RNA-Polymerase (LAMB und KOLAKOWSKI, 2001), die jedoch nur zusammen mit P und NP Proteinen wirken kann (YOSSOF und TAN, 2001). Neben den sechs Hauptproteinen gibt es noch zwei weitere Proteine, das V- und das W-Protein. Diese werden vom P-Protein mit Hilfe eines alternativen Leserahmens translatiert (STEWART et al., 1993). Das V-Protein bindet Zink (SAMSON et al., 1991) und ihm wird eine Rolle bei der Virusreplikation und als Pathogenitätsfaktor zugeschrieben (MEBATSION et al., 2001).

### **2.2.2 Tenazität von aviären Paramyxoviren**

Das Virus ist durch gängige Desinfektionsmittel wie Aldehyde und Chlorverbindungen und auch durch Temperaturen über 56°C innerhalb von 30 Minuten zu inaktivieren (KALETA, 1992). In Kot und Kadavern ist es dagegen relativ lange haltbar. Kühl kann es in Kadavern über Wochen, gefroren sogar über Jahre infektiös bleiben. Auch in Kot wird es sogar bei Temperaturen von 37°C über einen Monat lang nicht inaktiviert (ALEXANDER, 2001a). In frischen Eiern hält sich das Virus bei Raumtemperatur bis zu 235 Tage, bei 4°C sogar mindestens 538 Tage. In verseuchten Ställen muss noch einen Monat nach Entfernung der erkrankten Tiere mit infektiösen Viren gerechnet werden. Durch Eintrocknung kann das Virus über Jahre konserviert werden (KADDEN, 2002)

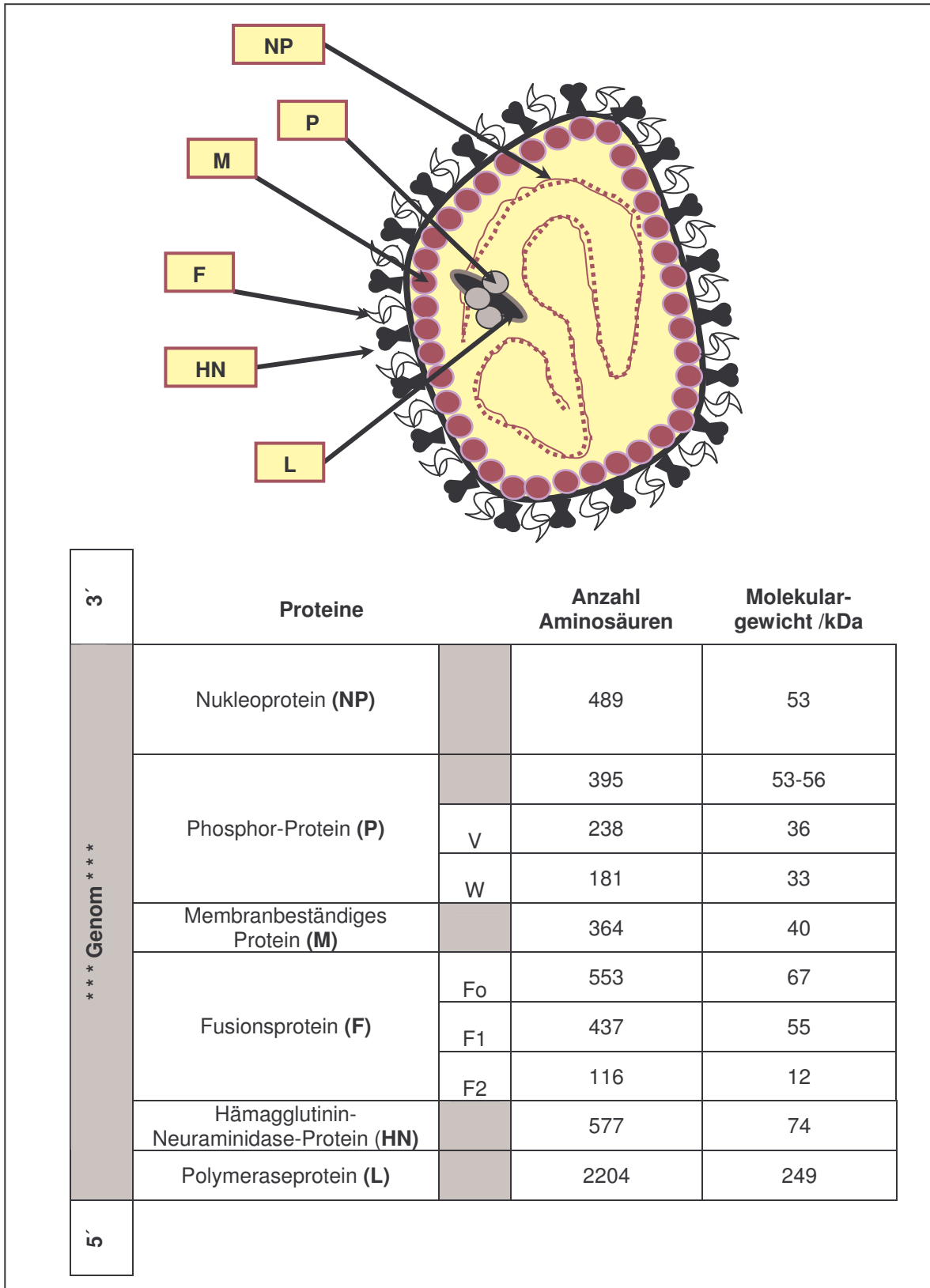


Abb.2: Schematische Darstellung eines aviären Paramyxovirus und Charakterisierung der einzelnen Virusbestandteile nach ihrem Molekulargewicht und Ihrer Aminosäureanzahl (nach GRUND, 2004)

### 2.2.3 Serotypen und Wirtsspektrum von aviären Paramyxoviren

Aviäre Paramyxoviren lassen sich auf Grund der viralen Oberflächenantigene über den Hämagglutinationshemmungstest (HAH) in neun Serotypen (APMV-1 bis -9) unterteilen (ALEXANDER, 1988) (Tab. 1).

Das aviäre Paramyxovirus des Serotyp-1 besitzt von den neun Serotypen die größte klinische und wirtschaftliche Bedeutung. Die Serotypen -2, -3, -6 und -7, können bei Hühnern und Puten jedoch auch Krankheitsbilder hervorrufen (ALEXANDER und SENNE, 2008). Dem Serotyp APMV-1 ist ein relativ breites Wirtsspektrum eigen. Für diesen ist die Empfänglichkeit von 236 Spezies aus 27 von 50 Ordnungen der Klasse Aves bereits beschrieben. Es gelten aber alle Arten als empfänglich (KALETA und BALDAUF, 1988), wobei sich unter den Wirtschaftsgeflügelpezies die klinische Symptomatik bei Huhn (*Gallus gallus dom.*) und Pute (*Meleagris gallopavo*) am stärksten manifestiert (ALEXANDER, 2008). Auch beim Menschen können sowohl virulente, als auch lentogene APMV-1 Stämme als Zoonoseerreger Infektionen hervorrufen. In erster Linie kommt es dabei zu lokalen Entzündungen eines oder beider Augen, die sich in Konjunktivitis, Lidödem und starkem Tränenfluss äußern können. Des Weiteren kann es zu Kopfschmerzen und grippeähnlichen Symptomen kommen, die Erkrankung ist aber nicht lebensbedrohlich. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch findet nicht statt (KADDEN, 2002; O.I.E. ,2008).

In Europa wurden bereits die Serotypen -1, -2, -3, -4, -5, und -6 nachgewiesen, der Serotyp-7 wurde in den USA und Japan, aber auch England identifiziert (RITCHIE, 1995)



**Tab.1:**

**Prototypen der Paramyxovirusserotypen 1-9 (modifiziert nach RITCHIE, 1995)**

<b>Prototyp Virusstamm</b>	<b>Wirtsspezies</b>	<b>Klinische Symptome</b>	<b>Verbreitung</b>
<b>APMV-1:</b> Newcastle Disease Virus	Vögel und andere Spezies	Je nach Pathotyp und Wirt inapparent bis zu 100% Mortalität	Weltweit
<b>APMV 2:</b> chicken/California/Yucaipa/56 (BANKOWSKI et al., 1960)	Puten, Hühner,  Sperlingsvögel Sittiche, Rallen	Legerückgang  Milde respiratorische Erkrankungen bei Sperlingen und Sittichen	Europa, Afrika,Asien, N und S- Amerika
<b>AMPV 3:</b> turkey/Wisconsin/68 (TUMOVA et al.,1979b)  <b>APMV 3</b> parakeet/Netherlands/449/75	Puten,  Sittiche, Sperlingsvögel	Milde respiratorische Erkrankungen,  Tödliche Erkrankung Milde-tödliche Erkrankung	Europa, Nord- Amerika, Japan
<b>APMV 4:</b> duck/Hong Kong/D3/75 (SHORTRIDGE et al., 1980)	Enten, Gänse	Erkrankungen bei Geflügel nicht bekannt	N-Amerika, Europa, Neuseeland Australien Japan, China
<b>APMV 5:</b> budgerigar/Japan/Kunitachi/1/ 76 (NEROME et al., 1978)	Wellensittiche	Hohe Mortalität beim Wellensittich Erkrankungen bei Geflügel nicht bekannt	Japan, Europa, evtl. Australien
<b>APMV 6:</b> duck/Hong Kong/199/77 (SHORTRIDGE et al., 1980)	Enten, Gänse, Puten, Rallen	Asymptomatisch bei Wassergeflügel, milde respiratorische Erkrankungen bei Puten	Kanada, Europa, Japan, China Hong Kong
<b>APMV 7 :</b> dove/Tennessee/4/75 (ALEXANDER et al., 1981)	Tauben, Puten, Strauße	Milde respiratorische Erkrankungen bei Puten	USA, Japan und England
<b>APMV8:</b> Goose/Delaware/1053/76 (ALEXANDER et al.,1983)	Enten und Gänse	Asymptomatisch	USA, Japan
<b>APMV 9:</b> Domestic duck/New York/22/78 (ALEXANDER et al., 1983)	Enten	Asymptomatisch	USA

## 2.3 DAS AVIÄRE PARAMYXOVIRUS-1

### 2.3.1 Einteilung des APMV-1 in Stämme, Genotypen und Pathotypen

Neben der antigenetischen Differenzierung einzelner Serotypen, ist eine molekularbiologische Charakterisierung der APMV-1 Stämme möglich. Das APMV-1 lässt sich so in **zwei Klassen** einteilen (CZEGLEDI et al., 2006; KIM et al., 2007; SEAL et al., 2004). Die Stämme der Klasse I wurden in den meisten Fällen aus Wassergeflügel isoliert. Die **Klasse II** enthält **neun Genotypen**, die alle klassischen Impf- und Seuchenstämmen des Wirtschaftsgeflügels sowie die Paramyxoviren der Taube (Genotyp VI) repräsentieren (COLLINS et al., 1993; KIM et al., 2007). Antigenetisch lassen sich innerhalb des Serotyp-1 mit Hilfe einer standardisierten Palette monoklonaler Antikörper weitere Differenzierungen in verschiedene **Stämme** vornehmen. So ist auch der Taubentyp P von anderen Aviären Paramyxoviren des Serotyp-1 abzugrenzen (RUSSEL und ALEXANDER, 1983; ALEXANDER et al., 1985 a; 1987; COLLINS et al., 1989).

Eine weitere Einteilung des APMV-1 erfolgt nach dem klinischen Bild, welches es im Hauptwirt Huhn auszulösen vermag. Demnach werden **4 Pathotypen** unterschieden (BEARD und HANSON, 1984).

**Velogen:** Diese Form löst akute Verläufe aus, bei denen sich die Erkrankung schnell in allen Altersstufen ausbreitet und die mit einer hohen Mortalitätsrate einhergeht. Teilweise versterben die Tiere nach 5-6-tägiger Inkubationszeit ohne vorherige Symptomatik. Bei velogenen Krankheitsbildern ist zwischen einem *velogen viscerotropen* Verlauf, bei welchem vor allem zu gelbgrünlichen, zum Teil blutigen Durchfällen kommt, und einem *velogen neurotropen* Verlauf, der mit überwiegend respiratorischen und später auch neurologischen Symptomen einhergeht, zu unterscheiden. Bei beiden Verläufen sind auch Allgemeinsymptome wie gesträubtes Gefieder, Hängenlassen der Flügel und Legerückgang, sowie Eimissbildungen zu beobachten.

**Mesogen:** Klinische Krankheitsverläufe nach Infektion mit diesem Pathotypen sind altersabhängig. Küken erkranken zu 100%, während erwachsene Hühner meist eine Morbidität von unter 50% aufweisen. Die Symptome bestehen vor allem in einem Rückgang der Futteraufnahme und der Legeleistung, seltener können auch respiratorische und neurologische Symptome beobachtet werden. Die Mortalität liegt zwischen 5% und 50 %.

**Lentogen:** In der Regel treten bei Infektionen durch einen solchen Pathotyp nur bei Hühnerküken milde respiratorische Symptome auf. Diese Stämme werden auch als Lebendimpfstämme eingesetzt.

**Apathogen:** Die Infektion mit diesem Pathotyp beschränkt sich meist auf den Intestinaltrakt, ohne eine klinische Symptomatik hervorzurufen.

Eine Einteilung in Pathotypen und somit die Einschätzung der Virulenz eines APMV-1 Stammes wird ermöglicht durch die Bestimmung eines *intracerebralen Pathogenitätsindex* (ICPI). Hierfür werden Eintagsküken (*Gallus gallus*) intracerebral mit Virus infiziert (ALEXANDER, 1989; O.I.E. 2008; Richtlinie 92/66/EWG). Anhand der klinischen Manifestation und der induzierten Sterblichkeit über einen Zeitraum von acht Tagen erfolgt die Ermittlung des Index, der sich nach täglicher Einteilung der Tiere in gesund=0, krank=1, oder gestorben =2, berechnen lässt. Demnach kann ein ICPI Werte zwischen 0, wie bei apathogene Stämmen und 2, wie bei hochpathogenen Stämmen, liegen (Tab 2). Das Office Internationale des Épizooties (O.I.E.) nutzt diese Charakterisierung bei der Definition von ND. Bei einem ICPI > 0,7 wird von einem Seuchenrelevanten Virusisolat ausgegangen und das Geschehen als ND-Ausbruch mitgeteilt. Der *intravenöse Pathogenitätsindex* (IPVI) errechnet ebenfalls eine Indexzahl. Hierfür werden 8 Wochen alte Hühnerküken intravenös infiziert und die klinischen Befunde werden bewertet.

Andere Möglichkeiten zur Beurteilung der Pathogenität eines Stammes bietet die Infektion embryonierter Hühnereier. Hierfür werden 9 bis 11 Tage bebrütete Hühnereier infiziert und anschließend die durchschnittlichen Absterbezeit in Stunden „mean death time“, MDT) als Maß für die Virulenz des Erregers ermittelt (O.I.E., 2008).

**Tab. 2:**

**Einteilung von Aviären Paramyxoviren auf Grund Ihrer Virulenz**

(WERNER et al.,1999; KOMMERS et al.,2001)

	<b>MDT</b>	<b>ICPI</b>	<b>IVPI</b>
<b>lentogen</b>	> 90 Std	< 0,7	0
<b>mesogen</b>	60-90 Std	0,7-1,5	-2
<b>velogen</b>	< 60 Std	>1,5	2,0-3,0

Des Weiteren lassen sich bei Virusanzucht in der Zellkultur velogene und mesogene Stämme von lentogenen unterscheiden. Nur die velogenen und mesogenen Stämme sind in der Lage, trypsinunabhängig in Hühnerembryofibroblastenkulturen zu replizieren, was zur sichtbaren Plaquebildung führt. Diese Plaquebildung weist auf die Spaltbarkeit des F0-Proteins der Viren durch zelleigene Proteasen hin (REEVE et al., 1979) und ist ein Zeichen für Virulenz.

Auf *Genomebene* wird für eine Einschätzung der Pathogenität eines APMV-1 Stammes die Proteinsequenz der Spaltstelle des F0-Proteins an der es in seine funktionellen Untereinheiten F1 und F2 gespalten wird, untersucht (GARTEN et al., 1980, PEETERS et al., 1999). Die molekularbiologische Einteilung in Pathotypen lässt jedoch im Unterschied zu der biologischen Einteilung nur eine Einteilung in apathogen/lentogen bzw. mesogen/velogen zu, ohne Möglichkeit zur weiteren Charakterisierung innerhalb dieser Differenzierung.

### **2.3.2 Bedeutung und Geschichte von APMV-1**

Aviäre Paramyxoviren des Serotyp-1 lösen die weltweit verbreitete Newcastle Disease (auch Atypische Geflügelpest) aus. Virulente Formen führen dabei zu hohen Verlusten beim Geflügel (KALETA, 1992a). Diese Krankheit ist daher anzeigepflichtig. Ein Ausbruch zieht zahlreiche tierseuchenrechtliche Regelungen nach sich. Tierverluste, Leistungsminderungen und Handelsbeschränkungen tragen zu wirtschaftlichen Verlusten bei. Als erstmalige Beschreibung der Krankheit gelten Berichte über Ausbrüche, die 1926 zeitgleich an zwei geographisch getrennten Orten

auftraten. Berichtet wird von Ausbrüchen zum einen auf der Insel Java, die heute zu Indonesien gehört (KRANEVELD, 1927) zum anderen auch in England in Newcastle on Tyne (DOYLE, 1927), worauf auch der Name der Krankheit zurückzuführen ist. Es wird vermutet, dass bereits vor diesem Datum Ausbrüche stattfanden, die nicht als solche erkannt, bzw. die mit der ähnlich verlaufenden hoch pathogenen Aviären Influenza (HPAI) verwechselt wurden (ALEXANDER, 2001a).

Der zweite größere Ausbruch betraf Europa in den späten 60ern. Der Ursprung hierfür wird in Asien vermutet. Eine Verbreitung der Seuche und auch eine Einschleppung nach Deutschland geschah wahrscheinlich durch den Handel mit infizierten Papageienvögeln aus Südamerika. Isoliert wurden hier die Genotypen V und VI.

Die dritte Panzootie wurde in den späten 80ern durch den Taubentyp des APMV-1 (Genotyp VIb) verursacht. Dieser ist immer noch in der ganzen Welt von Bedeutung (KALETA, 1992 a).

Ein NDV des Genotyp VII wurde 1984 isoliert, der für weitere ND Ausbrüche in vielen Ländern verantwortlich war und immer noch panzootisch ist (YANG et al., 1999; ALBONIK et al., 2004; BARBEZANGE und JESTIN, 2005).

## **2.4 AMPV-1 BEI TAUBEN (COLUMBIDAE)**

### **2.4.1 Entdeckung und Ausbreitung**

Auf eine Empfänglichkeit von Tauben für APMV-1 wird bereits im Jahre 1926 hingewiesen, nachdem Tauben experimentell mit virushaltigem Material infiziert wurden, das bei Hühnern die Newcastle Disease auslöste (DOYLE, 1927).

Von natürlich vorkommenden, jedoch inapparent verlaufenden APMV-1 Infektionen wird 1939 aus Indien berichtet (IYER, 1939). Bei der Gewinnung von Taubenpockenviren stellte man fest, dass nach experimenteller Infektion mit Gewebehomogenisaten bei Tauben ein Krankheitsbild erzeugt werden kann, welches dem der Newcastle Disease glich. Damals nahm man noch an, dass eine klinische Erkrankung durch eine per os Infektion nicht hervorgerufen werden konnte, wohl aber durch die Injektion des Erregers, was durch einen weiteren Versuch

---

bestätigt wurde (KASCHULA et al., 1952). Trotzdem wurde immer wieder von einer hohen Taubensterblichkeit in Zusammenhang mit ND-Ausbrüchen bei Geflügel berichtet (KRANEVELD, 1926; PICARD 1928; FARINAS 1930; KRETZER 1930). Die Ursache hierfür wurde jedoch nicht geklärt. Nach Berichten aus den USA kam es zu ND-Erkrankungen unter Hühnern. Die mit ihnen zusammen gehaltenen Tauben wiesen ebenfalls Krankheitszeichen auf (HANSON und SINHA, 1951). Mittels Hämagglutinationshemmungstest (HAH) konnten ND-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Der Versuch einer Virusisolierung misslang jedoch. In einem Bericht hatten sich Tauben durch die Futteraufnahme aus APMV-1 kontaminierten Trögen infiziert. Hier gelang eine Virusisolierung aus dem Kot der Tauben, mit dem die Autoren wiederum Hühner infizieren konnten (KRANEVELD und MANSJOER, 1950). In Deutschland wurde zum ersten Mal 1971 von einem Krankheitsausbruch unter Tauben berichtet, bei dem in kurzer Zeit sieben von 18 Tauben eines Bestandes gestorben waren (HILBRICH, 1972). Es gelang APMV-1 Virus zu isolieren.

Anfang der 80er Jahre kam es zum ersten seuchenhaften Ausbruch unter domestizierten Tauben (*Columba livia domestica*). Die Population von domestizierten Tauben in der Welt zu dieser Zeit war größtenteils ungeimpft und somit voll empfänglich für das Virus (ALEXANDER, 2001a). Allein in Großbritannien kam es von Juli bis Dezember 1983 zu Ausbrüchen in 192 Taubenschlägen und im Jahr 1984 zu 866 Ausbrüchen, also insgesamt zu 1058 Ausbrüchen in Brieftauben bis zum Ende des Jahres 1984 (ALEXANDER et al., 1986b). In der Zeit von 1983 -1985 wurden in England 76 Proben tot aufgefundener verwilderter Haustauben (Straßentauben, *Columba livia*) untersucht. Aus 64 Virusanzuchten wurde fünfmal APMV-1 isoliert. Es wurden 11 Seren im HAH APMV-1 positiv getestet, was allerdings 50 % der untersuchten Seren ausmachte (LISTER et al., 1986).

Der für diese Ausbrüche verantwortliche Erreger konnte durch die Verwendung monoklonaler Antikörpern innerhalb des APMV-1 als Subtyp P (Pigeon), „Taubentyp“ oder PPMV-1 differenziert werden (ALEXANDER et al., 1985a, 1987, COLLINS et al., 1989, RUSSEL und ALEXANDER, 1983). Der Ursprung der Krankheit wird im Mittleren Osten vermutet, wo in den späten 70ern eine verlustreiche Erkrankung unter Tauben auftrat (KALETA et al., 1992a). Diese wurde zunächst noch als virale Enzephalomyelitis bzw kontagiöse Paralyse bezeichnet (AL FALLUI et al., 1979; MOHAMMED et al., 1978). Als Ursache hierfür wurde ein Herpesvirus vermutet, der

aus den erkrankten Tauben isoliert werden konnte (TANTAWI et al., 1979). Erst später konnte ein APMV-1 Virus isoliert und als PPMV-1 charakterisiert werden (KALETA et al., 1985).

In Europa wurde PPMV-1 zuerst in Italien im Jahr 1981 nachgewiesen (BIANCIFIORNI und FIORINI, 1983). In Deutschland kam es 1982 erstmals in Bayern zu einem seuchenhaften Ausbruch (RICHTER et al., 1983). Im gleichen Bestand wurden auch Hühner und Fasane gehalten, die zwar eine Serokonversion zeigten, jedoch nicht erkrankten. In den USA konnte 1984 das erste Mal PPMV-1 isoliert werden (PEARSON et al., 1987). Im Jahr 1985 konnte das Geschehen als Panzootie bezeichnet werden. Die Verbreitung der Seuche erfolgte sehr rasch auf Grund von Handel, Flugwettbewerben und Ausstellungen (ALEXANDER et al., 1984c).

Heute ist die PPMV-1 Infektion unter Tauben weltweit verbreitet und führt noch immer zu Erkrankungen und Verlusten (ALEXANDER, 2001a).

#### **2.4.2 Einordnung und Vorkommen von APMV Isolaten bei Tauben**

Aus Tauben isoliertes APMV-1 ist meist PPMV-1 zuzuordnen (ALEXANDER et al., 1985a; WERNER et al., 1999). Die unter diesem Subtypen zusammengefassten Isolate können genotypisch der Klasse II, Genotyp VIb zugeordnet werden und bilden dort eine separate Gruppe (Tab. 3). Nach der Nomenklatur von Aldous, die eine Einteilung der APMV-1 Stämme in 6 Linien vornimmt, sind PPMV-1 Isolate der Linie 4b zuzuordnen. Innerhalb der Linien bestehen jedoch noch beachtliche genetische Unterschiede, was eine weitere Einteilung in 13 Sublinien rechtfertigt. Taubenisolate gehören hier meist in die Linien 4bi und 4bii, die wiederum in je 3 Gruppen unterteilt werden können. Die Zugehörigkeit der Isolate scheint mehr vom Zeitpunkt ihrer Isolation als von ihrer geographischen Herkunft abzuhängen. Die beiden Hauptlinien 4bi und 4bii gehen auf des früheste Isolat, das 1879 im Irak gewonnen wurde, zurück (ALDOUS et al., 2003, 2004).

**Tab 3:**  
**Charakterisierung von APMV-1 Isolaten aus Tauben**

<b>Einteilung nach Virulenz:</b>	<b>Einteilung auf Genomebene</b>		<b>Einteilung nach antigenetischen Unterschieden</b>
<b>Pathotypen:</b> lento-, meso-, velo und apathogen meist <b>mesogen</b>	<b>Klasse:</b> II  <b>Genotypen:</b> meist Genotyp <b>VI</b>	<b>Linie</b> meist <b>4b</b>	<b>Serotypen:</b> meist-1  <b>Stämme:</b> meist <b>P</b>

Während PPMV-1 bei Tauben am häufigsten Isoliert wird, treten auch andere APMV Stämme, vor allem in Zeiten von ND Ausbrüchen bei Tauben auf (Werner et al., 1999). So konnten bei einer Untersuchung von 148 erkrankt oder tot aufgefundenen Tauben aus dem Raum Berlin 66 APMV-1 Isolate gewonnen werden. Von diesen aus den Jahren 1991-1997 stammenden Proben wurden 55 Isolate mittels ICPI und monoklonaler Antikörper charakterisiert. Dabei wurden 50 als PPMV-1 und 5 als velogenes APMV-1 vom Hühnertyp identifiziert (HLINAK et al., 1998).

Bei einer weiteren umfangreichen Untersuchung durch das deutsche nationale Referenzlabor konnten 129 (75,5%) von insgesamt 171 Tauben APMV-1 Isolaten aus ganz Deutschland, aus den Jahren 1992-1996, als PPMV-1 identifiziert werden (WERNER et al., 1999). Des Weiteren konnten 25 lento- und 17 velogene Pathformen des APMV-1 bei Tauben nachgewiesen werden, die nicht zum PPMV-1 gehörten. Dabei konnten die meisten lentogenen Isolate als Impfstamm LaSota identifiziert werden. Andere lentogene Isolate waren vermutlich dem Impfstamm Hitchner zugehörig. Die velogenen Stämme repräsentierten das aktuelle Seuchenvirus.

Auch serologische Befunde bestätigen die Verbreitung von APMV-1 bei Tauben. Eine Studie aus Berlin ermittelte bei der serologischen Untersuchung von 321 Tauben (118 Stadttauben, 203 Rassetauben) mittels HAH bei Stadttauben eine Seroprävalenz von 26,2 %, bei Rassetauben dagegen von 16,2% (HLINAK et al., 1998). Nach anderen Berichten wurden auch Antikörper gegen die APMV Serotypen -2 und -3 häufig bei Tauben festgestellt. So waren bei Haustauben aus Südsanien 13,7% der Serumproben APMV-2, und 2 % APMV-3 positiv im HAH (MALDONADO et al., 1994). In einer retrospektiven Studie von KALETA und HEFFELS (1982)



wurden 1257 Seren von Brieftauben aus den Jahren 1976-1980 aus den gesamten Bundesgebiet mittels HAH untersucht. In dieser Studie war kein einziges Serum APMV-1 positiv, dafür wurden 138 (25%) APMV-2 positiv und 118 ( 25,4%) APMV-3 positiv getestet. Die Titer reichten bei den APMV-3 seropositiv gewerteten Seren von 1-6 bzw. von 1-8 bei den APMV-2 seropositiv getesteten Seren. Alle positiv getesteten Seren entstammten den Jahren 1979 und 80. Zu dieser Zeit wurden die entsprechenden Serotypen auch bei Hausgeflügel nachgewiesen.

Tauben stellen auch den natürlichen Wirt für APMV Serotyp 7 dar, der 1975 aus den USA isoliert werden konnte (ALEXANDER, 1981).

### **2.4.3 Die PPMV-1 Infektion bei der Taube**

#### **2.4.3 1 Infektionsverlauf, Erregertropismus und Persistenz**

Die Aufnahme des Erregers geschieht über die Schleimhäute des Respirations- oder Digestionstraktes. Demnach ist eine Infektion über die orale Aufnahme oder durch Inhalation des Erregers möglich. Auch die Art der Virusausscheidung hängt von betroffenen Organen ab und kann über Sekrete, Kot oder die Nieren erfolgen (KALETA 1992a). Nach der Aufnahme ist die Erregerausbreitung in erster Linie abhängig von der Virulenz des Virusstammes. Nach experimenteller Infektionen von Tauben mit PPMV-1 wurden Lunge, Milz, Leber, Leukozyten, Gehirn, Nieren und Kot untersucht. Am häufigsten und auch über den längsten Zeitraum gelang die Virusisolation aus Kot und Nieren der Tauben. Doch auch aus diesen Proben war ein Nachweis nur bis zum 13. Tag p.i. möglich (WARRLICH, 1988). Oft tritt eine Infektion erst nach dieser Nachweisgrenze klinisch in Erscheinung, da die Inkubationszeit 7-14 Tage und in Ausnahmefällen bis zu vier Wochen betragen kann (ALEXANDER et al., 1984c). Die Erklärung hierfür liegt offenbar darin, dass in der späten Phase der Infektion nur noch geringe Virusmengen vorliegen. Mittels PCR, die auch geringste Mengen viraler RNA zu detektieren vermag, ist ein Nachweis von APMV-1 in Organen über einen längeren Zeitraum möglich. In der frühen Infektionsphase (Tag 2-7), ist das Ergebnis des Virusnachweises mittels Anzucht in embryonierten

Hühnereiern und mittels RT nested PCR noch vergleichbar. In der späten Phase (Tag 21-31), liegt die Nachweisrate der RT-PCR bei 66%, die der Virusisolation nur bei 11,8% (BARBAZANGE und JESTIN, 2002). BARBEZANGE und JESTIN führten einen Screeningversuch durch, um mittels RT-PCR die Viruspräsenz und den Verlauf der maximalen Dauer der Nachweisbarkeit in verschiedenen Organen zu untersuchen (Tab.4). Nach oculo-nasaler oder nach Kontaktinfektion der Tauben, wurden anschließend Untersuchungen der Organe mittels RT-PCR bis zu 31 Tage nach der Infektion (p.i) durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Erregerverbreitungen festgestellt (BARBEZANGE und JESTIN, 2003). Am häufigsten und längsten wurde Virus aus der Lunge, den Caecaltonsillen, der Milz und den Nieren nachgewiesen, seltener aus dem Verdauungstrakt, der Leber, Pankreas und der Trachea.

**Tab.4:**

**Nachweisdauer von APMV-1 mittels RT-PCR in verschiedenen Organen**

<b>Organ</b>	<b>Nachweisbeginn</b>	<b>Nachweisende</b>
<b>Trachea</b>	2. Tag p.i.	1. Tag p.i.4
<b>Lunge</b>	2. Tag p.i.	31. Tag p.i.
<b>Lymphoide Organe</b>	2. Tag p.i.	31. Tag p.i. (Bursa fabritius–28. Tag p.i.)
<b>Pankreas</b>	4. Tag p.i.	10. Tag p.i.
<b>Verdauungstrakt</b>	4. Tag p.i.	14. Tag p.i. (vereinzelt länger)
<b>Leber</b>	4. Tag p.i.	14. Tag p.i.
<b>Niere</b>	4. Tag p.i.	31. Tag p.i.
<b>Hirn</b>	7. Tag p.i.	31. Tag p.i.

### **2.4.3.2 Klinisches Bild**

Auch bei Tauben lassen sich verschiedene Verlaufsformen erkennen, worauf nicht nur der Erreger selbst, sondern auch das Alter der Tiere, Menge und Weg der Erregeraufnahme und Sekundärinfektionen Einfluss haben (KALETA et al., 1992a). Die Inkubationszeit beträgt 7-14 Tage (bis zu 4 Wochen), danach kommt es im Falle

von klinischen Erkrankungen zu Symptomen (ALEXANDER et al., 1984c). Diese äußern sich, ähnlich wie beim Huhn, in gestörten Allgemeinverhalten und grünlichem Durchfall als Folge einer katarrhalischen Enteritis. Die häufig auftretende Polyurie wird oft mit Durchfall verwechselt. Statt eines dünnflüssigen Kotes treten hier jedoch geformte Kotbestandteile auf, die von einer Wasserlache umgeben sind. In dieser Phase kann bereits ein Teil der Tauben verenden. Nach der Durchfall- bzw Polyuriephase können bei 5-30% der erkrankten Tauben neurologische Symptome beobachtet werden. Sie äußern sich in Torticollis, Bewegungs- und Haltungsstörungen von Flügeln und Ständern, die in fast allen Fällen einseitig sind. Zum Teil treten die neurologische Symptome auch ohne vorherige andere Symptome auf (KALETA, 1992a). Die neurologischen Symptome können über lange Zeit bestehen bleiben. Trotzdem können viele Tauben nach dieser Phase genesen, jedoch werden sie oft vorher vom Taubenhalter ausgemerzt (ALEXANDER et al., 1984c). Auch bei Tauben treten klinisch inapparente Formen auf, bei denen jedoch Virus ausgeschieden wird, so dass es zu einer unbemerkten Verbreitung der Viren kommen kann (KALETA et al., 1992a). Infektionen der Elterntiere während der Brut oder in der Aufzucht können zu erhöhter Kükensterblichkeit und zu Entwicklungsstörungen der Nachzucht führen (ALEXANDER et al., 1984c). Andere latente Infektionen bei Tauben wie zum Beispiel Herpesviren oder Chlamydien, können durch die Paramyxovirusinfektion aktiviert werden (KALETA, 1992a). Die Morbidität unter Tauben in betroffenen Taubenschlägen liegt zwischen 20 und 80 %, die Mortalität ist eher gering, wobei Schätzungen durch die Merzungsmaßnahmen von Taubenzüchtern erschwert werden (ALEXANDER et al., 1984c).

#### **2.4.3.3 Pathologisches Bild**

Das pathologisch-anatomische Bild der APMV-Infektion der Taube ist wenig ausgeprägt und eher unspezifisch. Beobachtet werden können eine katarrhalische Enteritis und Schwellungen von Milz, Nieren und Hirn (KALETA, 1992a).

Histopathologisch fallen neben einer nicht eitrigen, interstitiellen Nephritis (KÜCHLER, 1997) Veränderungen im ZNS auf. Hier treten ebenfalls nicht eitrig Entzündungen auf, die mononukleäre vaskuläre oder perivaskuläre Infiltrate

beinhalten können (FISCHER et. al., 1986). Auch Pankreasnekrosen konnten bei einem Infektionsversuch bei 11 von 39 Tauben gefunden werden (SCHMELLEKAMP, 2005)

#### **2.4.3.4 Bedeutung von APMV-1 Infektionen der Taube für Geflügel**

Die wohl bedeutendste Übertragung von PPMV-1 auf Hühner mit schwerwiegenden Folgen fand im Jahre 1984 in Liverpool statt. Durch Kot und Kadaver erkrankter Wildtauben (*Columba livia*), kam es in Lagerhallen zur Kontamination von Futter. In Folge dessen kam es zu mehr als 23 ND Ausbrüchen unter Hühnern, die das verseuchte Futter erhalten hatten (ALEXANDER, 1985b). Um die Seuche einzudämmen, erfolgte die Tötung von über 800.000 Hühnern und es entstanden Kosten von mehr als 2,2 Millionen englischen Pfund. Bei Hühnern führte die PPMV-1 Infektion bei den Ausbrüchen 1984 in England meist zu geringer Morbidität und Mortalität, hauptsächlich wurden Leistungsminderungen beschrieben. So kam es in Lege- und Zuchtbetrieben zum Abfall der Legeleistung von bis zu 90%. Teilweise traten hier auch Durchfälle auf. Zu zentralnervösen Symptomen und Todesfällen kam es vor allem bei Masthähnchen. Hier konnte die Mortalität bis zu 30% betragen. Andere Geflügelarten wie Hühner und Puten zeigten keine Krankheitszeichen. Es zeigte sich eine große Variabilität der PPMV-1 Isolate hinsichtlich ihrer Virulenz. Bis auf ein Isolat, dessen ICPI bei 0,7 lag, wies der ICPI der PPMV-1 Isolate, die für diese Ausbrüche verantwortlich waren, eine Spanne von 1,5 bis 2 auf. Der IVPI lag bei dem Isolat mit dem niedrigen ICPI bei 0, alle anderen Isolate zeigten einen IVPI zwischen 1 und 2,5.

Weitere Ausbrüche von ND bei Geflügel in Irland und Großbritannien in den Jahren 1991 und 1992, wurden ebenfalls durch PPMV-1 hervorgerufen.

Nach Untersuchungen der meisten PPMV-1 Isolate aus Tauben, lassen sich diese als mesogen einstufen, doch die Virulenz reicht von apathogen bis velogen. Eine umfassende Studie untersuchte 57 Virusisolate von Tauben aus 12 europäischen Ländern, Japan, Israel und dem Sudan aus den Jahren 1981-1983. Pathogenitätsprüfungen ergaben einen ICPI Wert von 1,06-1,79, der IVPI reichte von 0,00-2,44 (ALEXANDER et al, 1985a). ALEXANDER und PARSONS (1984) führten

Überprüfungen der Pathogenität von 40 PPMV-1 Isolaten durch, die von Tauben stammten. Die Isolate wurden in der Zeit der Ausbrüche unter Hühnern in England gewonnen. Der ICPI lag zwischen 1,28 und 1,76, der IVPI lag zwischen 0 und 1,81. Drei dieser Isolate mit stark unterschiedlichen IVPI-Werten aber ähnlichen ICPI-Werten, wurde an Tauben getestet. Nach intravenöser Infektion der Tauben zeigte sich, dass Isolate die für Hühner weniger pathogen waren, bei Tauben zu 100%iger Mortalität führen konnten. Bei den Tauben ergaben diese Isolate IVPI-Werte zwischen 1,26 und 1,81. Des Weiteren wurden anhand eines Isolates Versuche zu Kontaktinfektionen durchgeführt. Hierfür wurden Tauben intranasal infiziert und anschließend Tauben und Hühner als Kontaktvögel hinzustellen. Die Infektion löste sowohl bei den infizierten Tauben als auch den Kontakttauben eine mittels HAH nachweisbare Immunantwort aus. Bis zu 31 Tagen p.i. war Virusausscheidung zu detektieren, dennoch wurde bei den Tauben kaum klinische Symptomatik beobachtet. Bei den Hühnern kam es zu keinerlei klinischer Auffälligkeiten, obwohl auch sie eine Immunantwort zeigten und Virus ausschieden.

Bemerkenswerter Weise ließ sich der IVPI von drei PPMV-1 Isolaten durch 3-4 malige Passagierung in Hühnern auf etwa 2 steigern, unabhängig von seinem Ausgangswert. Dabei kam es zu einer Pathogenitätssteigerung sowohl für Hühner als auch für Tauben (ALEXANDER und PARSONS, 1984). Auch bei einer späteren Studie von Alexander und Parsons (1986) wurden 6 PPMV-1 Isolate, die für Tauben virulent waren, aber in Hühnern einen niedrigen ICPI aufwiesen in Hühnern passagiert. Drei von diesen Isolaten zeigten bei Ausgangswerten von 0,00- 0,34, einen Anstieg des IVPI nach 3 Passagen auf über 2,00. Der ICPI von zwei Isolaten stieg von 0,85 auf 1,47 bzw von 1,08 auf 1,37. Der IVPI stieg hier nicht an. Ein Isolat zeigte keinen Anstieg im ICPI, dafür einen IVPI Anstieg von 0,00 auf 0,53.

Experimentelle Pathogenitätsprüfungen mit acht PPMV-1 Isolaten an Tauben, Hühnern und Puten wiesen auf unterschiedliche Pathogenität des PPMV-1 für die verschiedenen Spezies hin. Die Tauben waren bei den Versuchen 7 Wochen, die Hühner 8, die Puten 6 Wochen alt. Die Tauben wurden i.m., die Hühner und Puten i.v. infiziert. Zur Pathogenitätsprüfung wurden pro Isolat je zwei Tauben, zwei Puten und drei Hühner eingesetzt. Die Tauben zeigten 4 bis 5 Tage nach der Infektion mit jedem der Isolate Polyurie. Auch traten nach 16 Tagen oder später Flügellähmungen und teilweise Torticollis auf. Zwei Isolate lösten bei je einer Taube den Tod nach 6

bzw. 20 Tagen aus. Auch in den Hühnern lösten die meisten Isolate ein ähnliches klinisches Erscheinungsbild aus. Ab dem 4. Tag p.i. konnten Apathie und Polyurie beobachtet werden. Ein Isolat führte zu keinerlei, ein weiteres nur zu milder Symptomatik. Todesfälle traten bei 4 von 24 Küken auf und betrafen je zwei Tiere bei zwei verschiedenen Isolaten. Bei den Putenküken führten zwei der Isolate zu keinen sichtbaren Symptomen, jedoch kam es durch zwei der Isolate zu Todesfällen beider Tiere am 4. Tag p.i. Des Weiteren verursachten vier der Isolate den Tod eines der beiden Tiere am 4. Tag p.i. Es waren zwei weitere Todesfälle an Tag 5 bzw. 6 zu verzeichnen. Bei den restlichen Tieren bewirkten die Isolate eine klinische Symptomatik, jedoch ohne neurologische Symptome (KALETA, 1992b).

Auch pathohistologische Veränderungen in Hühnern, ausgelöst durch PPMV-1 sind dokumentiert. Die hierbei getesteten PPMV-1 Stämme wurden zunächst in Hühnern passagiert. Es wurden 14 Tage p.i. vor allem Läsionen in Herz, Hirn und lymphoiden Organen festgestellt, ohne das unbedingt starke klinische Erscheinungen auftraten (KOMMERS et al., 2002). Tauben sind nicht nur für PPMV-1, sondern auch für velogene Hühnerstämme hoch empfänglich. So konnte in einem Experiment gezeigt werden, dass zwischen Tauben, die mit velogenem Hühner-ND infiziert worden waren und zugestellten gesunden Tauben eine Übertragung des Virus per Kontakt stattfinden konnte. Bei allen Tauben in diesem Experiment fand eine Infektion mit anschließender Antikörperreaktion und Virusausscheidung statt. Allerdings erkrankten die Tauben selber nicht an dem hühnerpathogenem ND-Stamm (DE OLIVEIRA TORRES CORRASCO et al., 2007)

Auch unter natürlichen Bedingungen konnten neben PPMV-1 auch öfters velogene APMV-1 Stämme aus Tauben isoliert werden. Unter 171 Isolaten aviärer Paramyxoviren von Tauben aus Deutschland war zumeist die Taubentyp Variante zu finden (129 von 171). Diese waren meist als mesogen einzustufen, allerdings gab es eine weite Spanne im ICPI mit Ergebnissen zwischen 0.71 und 1.65. Auch aus neun Hühnern, einer Ente und einem Fasan, die offenkundige Krankheitszeichen zeigten, wurde PPMV-1 isoliert. Des Weiteren konnten die Tauben auch Träger und somit möglicher Überträger des in dieser Zeit aktuellen velogenen Hühner APMV-1 sein (WERNER et al., 1999).

Eine aktuelle Studie aus China untersuchte 14 in den Jahren 1996 und 2005 aus Tauben gewonnene Isolate. Diese erwiesen sich meistens als mesogen (MDT 60 -90

Std, ICPI > 1,2). Phylogenetische Untersuchungen anhand des F-Proteins ließen eine Einteilung der meisten Isolate in die Klasse II, Genotyp VIb zu, welche den typischen PPMV-1 in Brieftauben repräsentiert. Drei Isolate jedoch wurden dem Genotyp VIIId zugewiesen, einem Genotypen, der für die die meisten Ausbrüche von ND in Geflügel in China seit Ende des letzten Jahrhunderts verantwortlich war (LIU et al., 2006).

## 2.5 GESETZLICHE REGELUNGEN

Aufgrund ihrer großen wirtschaftlichen Bedeutung wird die Newcastle Disease (ND) von dem Office Internationale des Epizooties (O.I.E.) als anzeigepflichtige Tierseuche geführt. Seit 1991 ist ND in allen EU-Mitgliedsstaaten anzeigepflichtig (Kadden, 2002).

Die Definition für ND ist im Health Code des O.I.E zu finden und lautet:

Newcastle Disease ist definiert als eine Infektion von Vögeln, hervorgerufen durch das aviäre Paramyxovirus Typ 1 (APMV-1), das einen der folgenden Kriterien für Virulenz erfüllt:

- a) das Virus hat einen intracerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) in Eintagsküken (*Gallus gallus*) von 0,7 oder höher, oder
- b) am C-terminalen Ende des F-2 Proteins sind mehrere basische Aminosäuren und an der Position 117 des N-terminalen Ende des F-1 Proteins ist Phenylalanin.  
(Mehrere basische Aminosäuren bedeutet wenigstens drei Arginin oder Lysin zwischen 113 und 116)

Auf europäischer Ebene jedoch umfasst die Definition nur die Bestimmung des ICPI. Innerhalb des europäischen Wirtschaftsraumes (Richtlinie 92/66/EWG) und auf nationaler Ebene (Tierseuchengesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 13. Dezember 2007; Geflügelpestverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom

20 Dezember 2005), sind Maßnahmen zur Vermeidung von Ausbrüchen und Schutzmaßregeln im Falle eines Ausbruches festgelegt. Die Regelungen für die Prävention und Bekämpfung von ND betreffen Geflügel. Dieses ist laut Geflügelpestverordnung definiert als: Enten, Gänse, Fasane, Hühner Laufvögel, Perlhühner, Rebhühner, Tauben, Truthühner und Wachteln, die zur Erzeugung von Fleisch oder Eiern, oder zu deren Zucht gehalten werden. Des Weiteren werden auch Brieftauben in der Verordnung erwähnt, allerdings gelten für sie nicht unbedingt die gleichen Regelungen wie für Geflügel.

Zur Prophylaxe ist in Deutschland und vielen anderen Ländern die Impfung von Hühnern und Puten gegen ND vorgeschrieben. Hierfür sind die zugelassenen Impfstoffe (Bundeszeiger-Veröffentlichung Nr 328 vom 8 Mai 2008) anzuwenden. Es handelt sich hierbei um lentogene Lebendimpfstoffe oder inaktivierte Vakzinen. Bei Hühnern und Puten kommen meist Lebendimpfstoffe in Einsatz (ALEXANDER, 1997). Die Entscheidung 93/152/EWG schreibt für attenuierte NDV-Lebendimpfstoffe einen intracerebralen Pathogenitätsindex von unter  $0,4 \text{ pro } 10^7 \text{ EID}_{50}$  und unter  $0,5 \text{ pro } 10^8 \text{ EID}_{50}$  vor. Als Impfstämme kommen weltweit vor allem Hitchner B1 und LaSota in Frage (ALEXANDER, 1997), wobei für Puten in Deutschland lediglich der Stamm LaSota zugelassen ist. Da der Impfstoff mittels Aerosol oder Trinkwasser appliziert werden kann, eignet er sich zur Herdenimpfung. Die Stämme Queensland und Ulster sind hitzeresistent und können daher in Futterpellets verabreicht werden und so auch in Entwicklungsländern eingesetzt werden (SEAL et al., 2000). Die Erstimpfung mit klassischen Lebendvakzinen erfolgt nach Herstellerangaben bis zum 14. Lebenstag. Je nach Nutzungsrichtung des Geflügels werden Nachimmunisierungen vorgenommen. Während der Produktionsperiode von Legehennen empfiehlt es sich im Abstand von zehn Wochen zu reimmunisieren (BEHR et al, 2008).

Inaktivierte Impfstoffe werden vor allem bei Tauben eingesetzt, aber auch bei Wirtschaftsgeflügel kommen sie zum Einsatz. Der Vorteil besteht in einer länger andauernden Immunität, so dass bei Legehennen von einem protektiven Schutz über die gesamte Legeperiode auszugehen ist (GALLILI & BEN-NATHAN, 1998).

Der Nachteil dieser Impfstoffe liegt allerdings in der Notwendigkeit einer mittels Injektion durchgeführten Einzeltierbehandlung. Für Tauben besteht keine generelle Impfpflicht. Der Verband deutscher Brieftaubenzüchter e.V. und der Bund deutscher



Rassegeflügelzüchter schreiben jedoch vor, dass nur geimpfte Tauben an Wettflügen und Ausstellungen teilnehmen dürfen. Dabei müssen nicht nur die teilnehmenden Tauben, sondern der gesamte Bestand geimpft sein. Die Impfung darf nicht weniger als zwei Wochen und nicht mehr als ein Jahr zurückliegen. Es werden inaktivierte Impfstoffe verwendet, die subkutan appliziert werden (KALETA, 1999).

Bei einem Ausbruch von ND bei Geflügel werden behördliche Maßnahmen angeordnet. Diese beinhalten die Tötung der Tiere, Vernichtung von toten Tieren, Eiern, Einstreumaterial, Errichtung von Sperr- und Beobachtungsgebieten für die Dauer von 30 Tagen sowie Desinfektionsmaßnahmen (Geflügelpestverordnung 2005). Für Tauben, die unter die Definition Geflügel fallen, besteht im Falle eines Ausbruchs von ND Anzeigepflicht und es gelten die entsprechenden behördlichen Regelungen. Reisetauben oder Rassetauben können jedoch auch den behördlichen Maßregelungen im Falle eines Ausbruches von ND unterliegen (Geflügelpestverordnung 2005, Richtlinie 92/66/EWG). Reisetauben sind Tauben, die von Ihrem Schlag entfernt, wegtransportiert und an andere Stelle frei fliegen gelassen werden (Richtlinie 92/66/EWG, Artikel 2g). Werden keine Maßnahmen wie im Falle eines Ausbruchs von ND in Geflügel getroffen, so dürfen im Verdachtsfall von ND die Tauben den Schlag nicht verlassen bis der Verdacht abgeklärt ist. Wird ND bestätigt, so müssen die Tauben zumindest 60 Tage nach Abklingen der klinischen Symptome im Stall verbleiben. Alle möglicherweise kontaminierten Gegenstände sind zu beseitigen oder zu desinfizieren (Geflügelpestverordnung 2005, Richtlinie 92/66/EWG).

In vielen Ländern sind Quarantänezeiten bei der Einfuhr exotischer Vögel vorgeschrieben, was auf die Erfahrungen mit Psittaziden beim zweiten ND Seuchenzug zurückzuführen ist (Richtlinie 2000/666/EG).

## **2.6 DIAGNOSTISCHE MÖGLICHKEITEN**

Der diagnostische Nachweis der Newcastle Disease erfolgt anhand von Virusisolaten sowie durch den Nachweis spezifischer Antikörper, die gegen diesen Erreger gerichtet sind. In Deutschland gelten für diese Nachweise bestimmte Vorschriften, die in der europäischen Richtlinie 92/99/EWG und in deren Anhang aufgeführten

---

Methoden festgelegt sind. Standardisierungsvorschläge sind auch im Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 (O.I.E.) zu finden.

### 2.6.1 Virusnachweis

Zunächst muss hierfür das Virus isoliert werden. Voraussetzung hierfür ist die bestehende Infektiösität desselben. Die Anzucht geschieht in embryonierten, spezifisch pathogenfreien Hühnereiern. Die virushaltige Amnioallantoisflüssigkeit kann anschließend gewonnen und dann das Virus mittels **Hämagglutinationstest** (HA) charakterisiert werden. Bei diesem Test wird die Fähigkeit des Virus zur Agglutination von Hühnererythrozyten zu diagnostischen Zwecken genutzt. Anschließend muss für die Diagnose ND noch der Pathotyp auf biologischer (ICPI, MDT,IVPI), oder auf molekularer Ebene (Sequenzierung), bestimmt werden. Die Deutschland gültige EU-Richtlinie (92/66EWG), lässt jedoch nur eine Einteilung über den ICPI zu.

Eine weitere Möglichkeit zum Virusnachweis ohne vorherige Isolation bietet die **Polymerasekettenreaktion (PCR)**. Der Vorteil besteht darin, dass das Virus hierfür weder infektiös noch intakt sein muss und auch minimale Mengen von Virus RNA detektiert werden. Allerdings ist hierüber nur bedingt eine Aussage über die Virulenz des Erregers möglich. Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) basiert auf der Amplifikation eines RNA-Fragments durch eine zyklische, enzymatische Reaktion. Hierbei werden mit Hilfe von Primern Desoxynukleotide an einen Komplementärstrang angelagert und so die RNA vervielfacht. Die Darstellung der Amplifikationsprodukte erfolgt durch Agarosegelelektrophorese und Anfärbung mit interkalierenden Farbstoffe wie Ethidiumbromid, die sich an doppelsträngige Nukleinsäureabschnitte anlagern (GAVRILENKO, 2006).

Ein neueres Verfahren bietet quantitative oder Real Time RT-PCR. Sie ermöglicht die Messung von Fluoreszenz, die während der Amplifikation eines RNA-Abschnittes auf Grund der Verwendung von Sonden frei wird. So kann sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage über in einer Probe vorhandenen Virus-RNA gemacht werden.

Je nach Fragestellung werden verschiedene PCR-Protokolle verwendet. Bei unbekanntem Virusstamm müssen so Verfahren mit großer diagnostischer Sensitivität gewählt werden, während für eine Feindifferenzierung sowie für die Pathotypisierung auf molekularer Ebene eine Abweichung einzelner Nucleotide erkannt werden muss.

## **2.6.2 Antikörpernachweis**

### **2.6.2.1 Hämagglutinationshemmungstest (HAH)**

Dieser Test gilt als serologischer Standardtest und beruht auf der Eigenschaft von APMV, Erythrozyten zu agglutinieren, sowie die Fähigkeit spezifischer, gegen APMV gerichteter Antikörper im HAH-Test dies zu unterbinden. Er ermöglicht sowohl die Typisierung von Isolaten, als auch die Spezifizierung von gegen APMV gerichteten Antikörpern. Als Standardantigen wird auf europäischer Ebene der Stamm Ulster 2C vorgeschlagen (Richtlinie 92/66/EWG). Dieser serologische Nachweis ist zur Kontrolle des Impferfolges besonders wichtig.

### **2.6.2.2 Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)**

Dieser Test wird länderspezifisch zugelassen. Momentan besteht in Deutschland eine Zulassung für vier Testkits. Das Prinzip beruht auf einer Bindung der spezifischen Antikörper an ein bestimmtes Antigen. Anschließend werden die gebundenen Antikörper durch einen zweiten, enzymmarkierten Antikörper detektiert und durch Zugabe eines Substrats, welches von dem Enzym umgesetzt werden kann, wird ein messbares Signal ausgesendet, das umso stärker ist je mehr Antikörper gebunden haben.

### **2.6.2.3 Western Blot (WB)**

Dieser Test gilt als recht spezifisch, wird aber auf Grund seiner aufwendigen Durchführung in der APMV-Diagnostik nicht standardisiert eingesetzt. Der Western Blot weist an eine Membran gebundene Proteine - der Größe nach aufgetrennt - sowohl qualitativ als auch quantitativ nach, bzw. die im Serum enthaltenen spezifischen Antikörper. Es ist dabei zu beachten, dass die Antikörper allerdings unter Umständen nur die native und nicht die im Western Blot zu Verfügung stehende denaturierte Form der Virusproteine erkennt (LUTTMANN et al., 2006). Desweiteren lassen sich durch den Western Blot auch Antikörper nach ihren Bindungseigenschaften an bestimmte Virusproteine charakterisieren. (HARLOW und LANE, 1988)

## **2.7 TAUBENVÖGEL (COLUMBIFORMAE)**

Die Ordnung der Taubenvögel, zur Familie der Vögel (*Aves*) gehörend, umfasst nur zwei Familien, von denen die eine, die Dronten (*Raphidae*) jedoch bereits ausgestorben ist (Abb. 3) (SCHERNER, 1980). Die Taubenvögel stehen den Papageien relativ am nächsten, sind aber insgesamt von anderen Vogelgruppen gut abgrenzbar. Die Familie der Tauben ist in 42 Gattungen mit etwa 303 Arten beinahe weltweit verbreitet und erreicht ihre größte Formenfülle in den Tropen. Die Gattung *Columba* ist mit 52 Arten die umfangreichste Taubengattung und fast weltweit verbreitet. Als Besonderheit der Tauben ist die Kropfmilch zu erwähnen, ein milchähnliches, antikörperhaltiges Sekret welches von den Kropfdrüsen beider Elterntiere sezerniert wird und mit welchem die Jungtiere ernährt werden. Tauben legen immer zwei Eier. Als Saugtrinker sind sie in der Lage, ihre Nasenlöcher zu verschließen und dann in mehreren Zügen Wasser zu sich zu nehmen.

## 2.7.1 Wildtauben in Deutschland

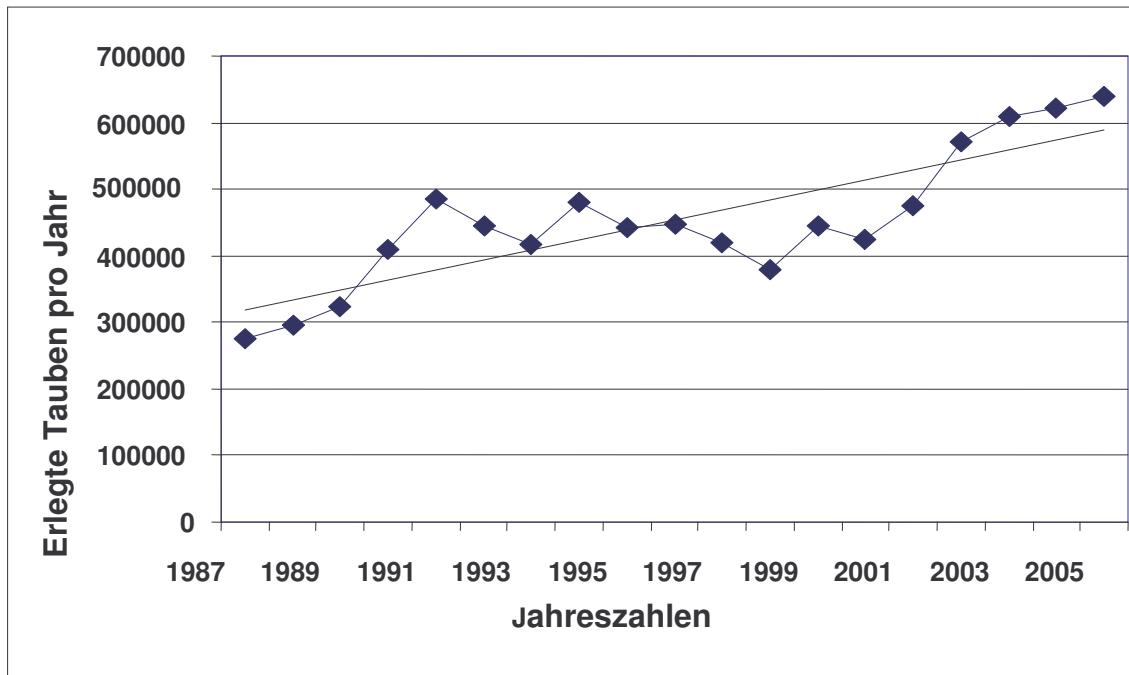
Insgesamt kommen in Deutschland vier Wildtaubenarten vor (Abb.3) (BETTMANN, 1973). Zwei von ihnen die Ringeltauben (*C. palumbus*) und die Hohltauben (*C.oeneas*) gehören der Gattung *Columba* an, und zwei die Turteltauben (*S. turtur*) und die Türkentauben (*S. decaocto*) der Gattung *Streptopelia*, Ringel- und Hohltauben sind Teilzieher, d.h. ein Teil der Vögel zieht nach der Brutzeit in ein Winterquartier, der andere Teil bleibt im Brutgebiet. Die Türkentaube ist ein Zugvogel, der über den Winter in Afrika lebt (SCHERNER, 1980). Zusätzlich ist die verwilderte Form der Haustaube (*Columbia livia domestica*), die von der Felsentaube (*Columba livia livia*) abstammt, häufig anzutreffen.

### 2.7.1.1 Verwilderte Haustauben (*Columba livia forma urbana*)

Die Urform der Haustaube, die Felsentaube, ist ein Standvogel und entfernt sich oft nur geringfügig von seinem Heimatort. Oft beträgt der Radius nicht mehr als 1300 m und selten mehr als 6 km. Es gibt 10 Unterarten der Felsentaube, die nahezu weltweit verbreitet sind (Übersicht bei GRÜLL, 1980). Die heutige domestizierte Form, der Haustaube (*C.l.forma domestica*), ist optisch identisch mit der Wildform, wenn die Haustaube keine abweichende Gefiederfärbung aufweist. Demnach sind dann auch die verwilderten Haustauben (Straßentauben) optisch nicht von der echten Wildform zu unterscheiden. Von den Straßentauben weisen etwa 20-30% die Wildfärbung auf. Straßentauben brüten in allen Ländern Mitteleuropas und sind hier vor allem in den Städten anzutreffen, hier zum Teil zu mehreren hundert Individuen. In dünn besiedelten Landstrichen scheinen sie dagegen stellenweise zu fehlen. Die Domestikation der *Columbia livia* geschah bereits 4500 Jahre v. Chr. im vorderen Orient, während sie nach Mitteleuropa erst im 2 Jh. n. Chr. kam. Die größte Verbreitung erlebte die Haustaube im Mittelalter. In Großbritannien spielte sie vom 13. bis ins 18. Jahrhundert eine große Rolle als Fleischlieferant, um 1650 wird der Gesamtbestand auf 10 Millionen Tiere geschätzt.

### 2.7.1.2 Ringeltauben (*Columba palumbus*)

Die Ringeltauben kommen in ganz Europa vor und sind ebenfalls von Kleinasien nach Persien, Mesopotanien und Palästina verbreitet (Übersicht bei SCHERNER, 1980). Es werden drei Subspezies unterschieden, die jedoch nur geringe Unterschiede aufweisen. Die Ringeltaube gehört zu den Teilziehern. Die im Norden heimischen ziehen im Winter hauptsächlich nach Südwesten und verbringen den Winter vorwiegend in atlantischen und mediterranen Räumen. Bedingt durch die milden Winter kann man aber zunehmend Standvögel in Deutschland beobachten. Im Nordwesten von Deutschland, Belgien und den Niederlanden beträgt der Standvogelanteil 45–70 %. Dagegen bestehen die Populationen Nordost-Europas ausschließlich, jene Skandinaviens und der Schweiz fast vollständig aus Zugvögeln. Ältere Vögel neigen eher zur Überwinterung als Jungvögel. In Mitteleuropa ist seit dem 19. Jahrhundert eine Bestandszunahme zu beobachten. Dies spiegelt sich auch in einem Anstieg der Jagdstrecken wieder. Wurden 1952/53 noch 68 500 Tiere erlegt so erreichte die Jagdstrecke in NRW 1979/80 eine Anzahl von 282 831 Ringeltauben (BETTMANN, 1973). Allein in NRW ist die Anzahl der erlegten Tauben 2005/6 auf 639020 Stück angestiegen. Ganz Deutschland hat eine Jagdstrecke von 960306 Ringeltauben zu verzeichnen (Abb.4). Ursächlich ist hierfür ist wahrscheinlich das steigende Nahrungsangebot durch zusätzlicher Ackerflächen und der vermehrte Anbau von Mais und Weizen. Für die Siedlungsdichte der Ringeltauben liegen nur Schätzwerte vor. Für Mitteleuropa wird durchschnittlich ein Paar pro km<sup>2</sup> angenommen. In vorwiegend landwirtschaftlich genutzten Flächen werden wesentlich mehr Ringeltauben angetroffen, bei Jülich, Nordrheinwestfalen werden über 13,5 Paare pro km<sup>2</sup> geschätzt und in Drenthe bis zu 66 Paare pro km<sup>2</sup>. Ringeltauben treten in Schwärmen von 1500 bis 2500 oder sogar 100.000 Tieren auf, sind aber auch vereinzelt oder Paarweise anzutreffen. Meist sind Gruppen von 10-100 Tieren zu beobachten. Bei der Nahrungssuche auf Feldern vergesellschaften sie sich oft mit anderen Spezies, vor allem anderen Columbidae. Mit diesen bilden sie auch zum Teil Zuggemeinschaften, aber auch hier ist eine Vergesellschaftung mit fremden Spezies wie z.B. Dohlen möglich. Ringeltauben können ein Alter von 16 Jahren und mehr erreichen.



**Abb.3:**

**Anstieg der Jagdstrecke von Ringeltauben in NRW von 1987–2005**

In NRW ist ein stetiger Anstieg der Ringeltaubenpopulation zu verzeichnen, die auch durch die erhöhten Abschusszahlen nicht zu dezimieren scheint.

(Angaben der Jagdstrecke DJV 2005)

<b>KLASSE:</b>	> <b>Aves</b>
<b>ORDNUNG:</b>	> <b>Columbiformes</b>
<b>FAMILIE:</b>	> <b>Columbidae</b> Raphidae (†)
<b>GATTUNG:</b>	> <b>Columba</b> (+ 41 weitere Gattungen)
<b>SPEZIES:</b>	> <b>C. Palumbus</b>
<b>SUBSPEZIES:</b>	> <b>C.p.palumbus (1)</b> <i>C.p. casiotis</i> <i>C.p. iranica</i> <i>C.p. azorica</i> <i>C.p. maderensis</i>
<b>SPEZIES:</b>	> <b>C.Oeneas (2)</b>
<b>SUBSPEZIES:</b>	<i>C.o.oeneas</i> <i>C.o.yarkandensis</i>
<b>SPEZIES:</b>	> <b>C. LIVIA</b>
<b>SUBSPEZIES:</b>	<i>C.l.livia</i> <b>C.l.forma domestica (3)</b> <b>C.l.forma urbana</b> > (+8 weitere Subspezies)
<b>SPEZIES:</b>	> (+ 49 weitere Spezies)
<b>GATTUNG:</b>	> <b>Streptopelia</b>
<b>SPEZIES:</b>	> <b>S. TURTUR</b> > <b>S. DECAOCTO (4)</b>
<b>SUBSPEZIES:</b>	> (4 Subspezies)

**Abb 4:**

**Einordnung der in Deutschland vorkommenden Subspezies innerhalb der Taubenvögel (Columbiformes)**

(nach SCHERNER, GRÜLL und HOFSTÄTTER, 1980)

(1)Ringeltauben, (2) Hohltauben (3) Haustauben, (4) Türkentauben



## **3. MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 PROBENNAHME**

Bei der untersuchten Taubenspezies handelte es sich um Ringeltauben (*Columba palumbus*, engl. wood pigeon oder ring dove).

Für die Probengewinnung wurde mit Jägern zusammengearbeitet, die die von ihnen im Rahmen des jährlichen Abschusses von Ringeltauben erlegten Tiere mit Einverständnis des Jagdpächters zur Verfügung stellten. Durch telefonische Absprache war es möglich, die Tauben sofort nach Abschuss entgegen zu nehmen. Die Proben wurden im Zeitraum von Juni bis Oktober der Jahre 2007 und 2008 gewonnen, wobei 134 Tauben im ersten und 108 Tauben im zweiten Jahr erlegt wurden. Auf Grund des schwarmhaften Auftretens der Ringeltauben in den Sommermonaten war es möglich, eine Stichprobe einer Population während eines begrenzten Zeitrahmens zu gewinnen.

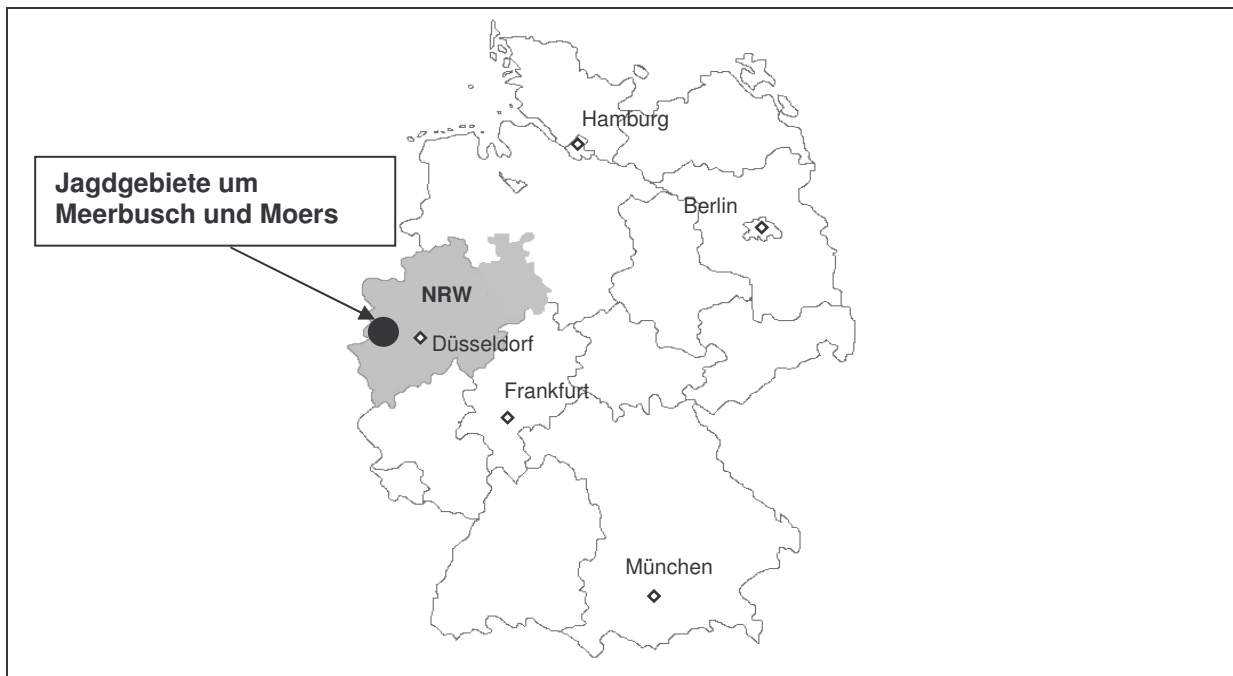
#### **3.1.1 Jagdgebiete**

Die Tauben stammten aus zwei verschiedenen Jagdgebieten aus Deutschland. Diese befanden sich im Krefelder Raum am linken Niederrhein, jedoch so nah beieinander, dass eine Vermischung der Taubenpopulationen als wahrscheinlich anzusehen war (Abb. 5). Das eine Jagdrevier lag in Moers Kapellen und umfasste 220 ha. Es teilte sich ein in ca. 10 ha Wasser, 100 ha Wald und 110 ha Feldfläche. Hier wurde von einer Ringeltaubenpopulation von ca. 4000 Stück während der Sommermonate ausgegangen.

Das andere Jagdgebiet in Meerbusch umfasste insgesamt 600 ha. Der Wiesen- und Ackeranteil betrug hier 480 ha, die Waldfläche 120 ha. Aus diesem Jagdgebiet stammte der Großteil der untersuchten Tauben. Die Gesamtpopulation wurde hier

auf ca. 10.000 Stück geschätzt, wobei es zu einem jährlichen Abschuss von etwa 1000 Tauben kommt. Laut den Tierseuchenkasseneinträgen gibt es zur Nutztierhaltung in Moers folgende Zahlen: Hühner 13.313, Puten 21, Enten 121, Gänse 384 und Tauben 762. Die Dunkelziffer mag aber höher liegen. In Meerbusch belaufen sich die Angaben bei Hühnern auf 2013 und bei Gänsen, Enten und Puten auf insgesamt 262.

In beiden Jagdgebieten kamen kleine Geflügelbestände mit Freilandhaltung vor und beide befanden sich in unmittelbarer Nähe der größeren Städte Krefeld und Düsseldorf bzw. Krefeld und Duisburg.



**Abb. 5:**  
**Geografische Einordnung der Jagdgebiete**

Dargestellt ist der Ort der Beprobung. Das Jagdgebiet befindet sich im bevölkerungsreichen Nordrhein Westfalen und ist umgeben von einer Vielzahl von Städten.

### **3.1.2 Probennahme**

Insgesamt wurden 241 Ringeltauben in die Untersuchungen einbezogen. Die Tauben wurden innerhalb einer bis drei Stunden nach Abschuss entgegen genommen und schnellstmöglich beprobt. Zunächst wurden das Gewicht der Tauben sowie das Geschlecht vermerkt und eine Altersschätzung (siehe 3.1.3) durchgeführt. Während der Beprobung wurde auf makroskopisch erkennbare pathologische Veränderungen geachtet. Es wurde Blut entweder aus dem Herzen oder, wenn es durch die Schussverletzungen in die Körperhöhle ausgetreten war, dort entnommen und anschließend ca. 15 min bei 900 rpm. zentrifugiert (HETTICH, EBA 8), um Serum zu gewinnen. Teilweise war das Blut schon geronnen, so dass sich aus den Blutkoagula durch Zentrifugation nur noch in kleinen Mengen Serum gewinnen ließ. Das gewonnene Serum wurde in Eppendorf Gefäße gefüllt und bei -20°C tiefgefroren. Es wurden Proben von den Nieren jedes Tieres entnommen und ebenfalls in Eppendorf Gefäßen bei -20°C gelagert. Die Proben wurden so lange bei -20°C gehalten, bis sie gekühlt zur weiteren Untersuchung in das Friedrich Loeffler Institut–Insel Riems verbracht wurden, wo sie weiterhin bei -20°C bis zu folgenden Untersuchungen gelagert wurden.

### **3.1.3 Altersschätzung**

Zur Altersschätzung wurden die Größe, sowie die Befiederung der Tauben herangezogen. Jung- und Alttauben unterscheiden sich in der Befiederung der Flügel (SCHERNER, 1980). Während bei Jungtauben die Deckfedern einen braunen Saum besitzen, erscheinen sie bei Älteren ohne Saum und bläulich (Abb. 6). Die juvenilen Handschwingen sind kürzer und schmaler als die der adulten Tauben. Durch diese Kriterien lassen sich jedoch nur Tauben von unter einem Jahr vor der Mauser von älteren Tauben abgrenzen. Selbst diese Schätzung ist jedoch unzuverlässig, da Armschwingen mitunter jahrelang unvermausert bleiben können. Da erst Ende April mit den ersten Jungtieren zu rechnen ist und bis Oktober Taubenproben genommen

wurden, konnte bei den Tauben die als Jungtauben identifiziert, ein Alter von maximal 6 Monaten angenommen werden.



**Abb. 6:**

**Gefieder von Jung und Alttaube im Vergleich.**

Abgebildet sind ein Flügelpaar einer juvenilen (oben), und einer adulten Ringeltaube (unten). Das Flügelpaar der juvenilen Taube ist kleiner und zeigt Federn mit bräunlichem Saum. Von diesem ist das untere von einer Alttaube stammende Flügelpaar anhand bläulicher Federn zu differenzieren. Des Weiteren ist die unterschiedliche Länge der Handschwingen als Unterscheidungsmerkmal zu erkennen.

(Foto von einem Präparat aus der Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten Nordrhein-Westfalen (LÖBV))

## **3.2 MATERIALIEN UND PUFFER**

### **3.2.1 Materialien für die PCR**

#### **RRT-PCR Platte**

---

(NERBE PLUS, Winsen)

#### **Proben**

---

extrahierte RNA der Nierengewebe-Proben der Ringeltauben

#### **Positivkontrolle**

---

extrahierte RNA des APMV-1-Stammes 599, eingestellt auf einen ct-Wert von 30. Dies entsprach einer Verdünnung von  $10^5$  der aus Allantoisflüssigkeit extrahierten RNA.

#### **RL Puffer**

---

(MACHEREY-NAGEL, Düren)

#### **Edelstahlkugel**

---

5mm Durchmesser (Werkstoffnr. 1.3541, ISOMETALL, Pleidelsheim)

#### **AlumaSeal® Aluminiumfilm**

---

(EXCEL Scientific, Wrightwood, CA, US)

### 3.2.1.1 M PCR

#### TE (Tris EDTA) Puffer (pH 8.0)

---

TRIS HCl,	1 M	500,0 µl (10mM)
EDTA,	0,5 M	100,0 µl (1mM)
Aqua bidest		49,4 ml (ad 50ml)

---

#### NDV M - Mix FAM: Primer und Sonden (OPERON, Köln)

---

Primer Wise M 4100+ (100 pmol/µl)	20 µl
Primer Wise M 4200- (100 pmol/µl)	20 µl
Sonde Wise M 4169FAM (100 pmol/µl)	12 µl
0,1 x TE (pH 8,0)	148 µl (ad 200 µl)

---

#### Endkonzentration

---

Primer +	10 pmol/ µl
Primer -	10 pmol/µl
Sonde	6 pmol/µl

---

#### Sequenzen von Primer und Sonde der NDV M PCR <sup>1</sup>

---

Primer M + 4100:	
5'-AGTGATGTGCTCGGACCTC-3'	Tm 51 (°C)
Primer M + 4220:	
5'-CCTGAGGAGAGGCATTGCTA-3'	Tm 54 (°C)
Sonde M+ 41:	
5'-[FAM]TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[BHQ 1]-3'	Tm 67,89 (°C)

---

<sup>1</sup>nach WISE et al, 2004

**Mastermix für die M PCR unter Zuhilfenahme des One-step RT-PCR Kits (QIAGEN, Hilden)**

Mastermix-Komponente		Volumen pro Ansatz
RNAse freies H <sub>2</sub> O	-	10,95 µl
5 x PCR buffer	-	5,00 µl
dNTP-Mix (Nucleotide)	-	0,80 µl
MgCl <sub>2</sub>	-	1,25 µl
Enzym-Mix	-	1,00 µl
NDV-M-Mix-FAM ( Primer–Sonden-Mix)	-	1,00 µl
Template RNA	-	5,00 µl

**3.2.1.2 NP PCR**

**Sequenz von Primer und Sonde der NP PCR<sup>2</sup>**

Primer 1	NDVnp-1066F	TGACAGYGACCAGATGAGCTT
Primer 2	NDVnp-1231R	CCTGAGCCTGAGCRACTC
Sonde	NDVnp-LNA3-FAM	5'-[FAM]-ACA1TCATTYTGGMGACT-[BHQ1]-3'

<sup>2</sup>nach WÄCKERLIN, 2009

**Mastermix für die NP-PCR unter Zuhilfenahme des dem Quantitec Probe RT-PCR Kits (QIAGEN, Hilden)**

Mastermix-Komponente		Volumen pro Ansatz
5x PCR Buffer	-	12,50 µl
Primer 1066F	-	1,00 µl
Primer 1231R	-	1,00 µl
Sonde NDVnp-LNA3-FAM	-	0,8 µl
RT-Mix	-	0,25 µl
RNAse freies H <sub>2</sub> O	-	5,25 µl
Gesamt Mastermix		20,00 µl
Template RNA	-	5,00 µl

### 3.2.2 Materialien für den ELISA:

#### Antigen

---

gradientengereinigtes APMV-1 Vollvirus (LaSota Clone 30, 1000µg /1000µl), verdünnt zu 10µg pro 1000 µl in Bicarbonatpuffer (HÄUSLAIGNER, 2008)

#### 1. Antikörper

---

- a) PPMV 1 positives Serum einer Taube, aus einem Infektionsversuch mit dem Stamm R/72/95 im Rahmen einer Impfstoffprüfung (SCHMELLEKAMP, 2005)
- b) definiert negatives Taubenserum von SPF Tauben aus der Klinik für Vögel, Tierärztlichen Fakultät, LMU München (MESSANA, 1998)
- c) Testserum der Ringeltauben

#### 2. Antikörper

---

gegen Taube gerichtetes, polyklonales Hyperimmunserum, gewonnen durch Immunisierung eines adulten Kaninchens (Charles Rivers) mit aufgereinigtem Tauben IgY (GRUND, 2004).

#### 3. Antikörper:

---

Gegen Kaninchen IgG gerichteter, mit Meerrettichperoxidase markierter Antikörper (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

#### ELISA Platten

---

96 Loch Platten Polysorp (NUNC)

#### Substrat

---

Ortho-phenylendiamidhydrochloride (OPD, SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

1 Tablette gelöst in 10 ml Citrate Phosphate Puffer: 0,05 M, pH 4, unter Zugabe von 4µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %



### **Bicarbonat Puffer pH 9.6**

---

Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ )	4,2 g	(ROTH, Karlsruhe)
--	-------	-------------------

ad 1l Aqua bidest

### **PBS Tween Puffer 0,025 % ig: (Waschpuffer):**

---

Natriumchlorid (NaCl)	0,80 g	(ROTH, Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	2,00 g	(ROTH, Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1,15 g	(ROTH, Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,20 g	(ROTH, Karlsruhe)
Tween 20	25,00 $\mu\text{l}$	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

ad 1L Aqua bidest

---

### **Blockpuffer:**

---

3 mg Magermilchpulver (Hobbybäckerversand, Bellenberg)  
ad 100ml Waschpuffer

---

## **3.2.3 Materialien für die SDS Page :**

### **Antigen:**

---

gradientengereinigtes APMV-1 Vollvirus  
(LaSota CLone 30, 1000 $\mu\text{g}$ /1000ml), 1,67  $\mu\text{g}$  pro mm bzw. 75  $\mu\text{l}$  pro Gel einer  
Verdünnung aus Antigen, NaCl 0,85% pH 7,4 und

**Laemmli Puffer** (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) im Verhältnis 1:1:2,  
denaturiert bei 99°C für 5 Minuten (**eppendorf Thermomixer compact**,  
(EPPENDORF, Hamburg) zur Dissoziation und Denaturierung der Disulfidbrücken  
der viralen Proteine.

### **Marker:**

---

prestained Protein Marker IV (PEQLAB, Erlangen), der zehn vorgefärbte Banden bei  
Proteingrößen zwischen 10 und 170 kDa aufweist, 5  $\mu\text{l}$  pro 0,5 cm Gelspur.

---

### **Sammelgelpuffer pH 6.8**

---

Ultra Pure Tris Base	9 g	(INVITROGEN, Carlsbad, USA)
ad 100 ml Aqua bidest		

---

### **Trenngelpuffer pH 8.8**

---

Ultra Pure Tris Base	18 g	(INVITROGEN, Carlsbad, USA)
ad 100 ml Aqua bidest		

---

### **Sammelgel**

---

Aqua bidest.	4 ml	
Acrylamid Stammlösung (Rotiphorese Gel 30)	1 ml	(ROTH, Karlsruhe)
Sammelgelpuffer	1 ml	
SDS 20%	30 µl	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
Tetramethyldiamin (TEMED)	4 µl	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
Ammoniumpersulfat 10%	100 µl	(ROTH, Karlsruhe)

---

### **Trenngel (10%)**

---

Aqua bidest.	5 ml	
Acrylamid Stammlösung (Rotiphorese Gel 30)	4 ml	(ROTH, Karlsruhe)
Trenngelpuffer	3 ml	
SDS 20%	60 µl	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
Tetramethyldiamin (TEMED)	8 µl	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
Ammoniumpersulfat 10%	100 µl	(ROTH, Karlsruhe)

---

### **Laufpuffer**

---

Ultra Pure Tris Base	3,02 g	(INVITROGEN, Carlsbad, USA)
Glycin	14,40 g	(ROTH, Karlsruhe)
SDS (20%)	5,00 ml	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
ad 1L Aqua bidest		

---

### 3.2.4 Materialien für den Western Blot:

#### Filterpapier

---

Whatman Gel Blotting Paper, GB 003, 0,8mm, (WHATMAN, Maidstone, UK)

#### Nitrozellulosemembran

---

9,5 x 7 cm, Porengröße 2 µm (PEQLAB, Erlangen)

#### Etiketten

---

63,5 x 33,9 mm (AVERY / DENNISON, ZWECKFORM, Holzkirchen)

#### Blotpuffer

---

Glycin	22,504 g	(ROTH, Karlsruhe)
Methanol	40,000 ml	(ROTH, Karlsruhe)
Ultra Pure Tris Base	4,840 g	(INVITROGEN, Carlsbad, USA)
ad 1L Aqua bidest		

---

#### TBST-Puffer pH 7,5

---

Tris HCL	15,76 g	(ROTH, Karlsruhe)
NaCl	17,54 g	(ROTH, Karlsruhe)
Tween 20	2,00 ml	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
ad 2L Aqua bidest		

---

#### Ponceau S

---

Eisessig	1,0 ml	(ROTH, Karlsruhe)
Ponceau S	0,2 ml	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
ad 100 ml Aqua bidest		

---

#### Blockpuffer

---

3 g Magermilchpulver (Hobbybäckerversand, Bellenberg)

ad 100 ml TBST-Puffer

---

### Testseren

---

entsprechend den Seren im ELISA und zusätzlich:

### Monoklonale Antikörper

---

Absterbekultur vom 29.05.07 aus dem Labor von KÖLLNER, FLI-Insel-Riems

1) mAK 36 **NP**

2) mAK 23 **P**

3) mAK 60 **HN**

### Monospezifisches Hyperimmunserum aus Kaninchen

---

1) Rabbit **F**:

Durch Immunisierung eines Kaninchens mit Bacculo-Virus exprimiertem F-Protein gewonnener monospezifischer Antikörper aus dem Labor VEITS, FLI, Insel Riems.

### APMV Hyperimmunseren aus Hühnern:

#### Referenzseren aus dem Friedrich-Loeffler-Institut - Insel Riems

---

<b>APMV-1</b>	ND-His. Hu 1980
<b>APMV-2</b>	His Ha 1983, Pool 1
<b>APMV-3</b>	1)His-Neth/499/75/ Hu 1983 (P) 2)His/tk/Engl/1087/836 Hu13 TV6 /99 (T)
<b>APMV-4</b>	His-Hu1984
<b>APMV-6</b>	His-Hu 1984
<b>APMV-7</b>	His/Hu-Ms,1984
<b>APMV-8</b>	His/Tv5/91/Hu53
<b>APMV-9</b>	His/TV9/97,1435

### Substrat

---

Super Signal West Pico Chemoluminescence Substrate , 70 µl / Streifen  
(PIERCE, Rockford, IL)

### Röntgenfilm

---

Amersham Hyperfilm TM MP (GE HEALTHCARE LIMITED, UK)

---

### 3.2.5 Materialien zum Färben eines Polyacrylamidgels

#### Coomassie

---

Coomassie Brilliant Blue	48 mg	(AppliChem, Darmstadt)
Methanol	50 ml	(ROTH, Karlsruhe)
Eisessig	200 ml	(ROTH, Karlsruhe)

ad 1 L Aqua bidest

---

#### Entfärber

---

Methanol	100 ml	(ROTH, Karlsruhe)
Eisessig	150 ml	(ROTH, Karlsruhe)

ad 1 L Aqua bidest

---

#### Fixierer

---

Methanol	200,0 ml	(ROTH, Karlsruhe)
Glycin	50,0 ml	(ROTH, Karlsruhe)
Eisessig	37,5 ml	(ROTH, Karlsruhe)

ad 1 L Aqua bidest

---

### 3.2.6 Materialien für den Hämagglutinationshemmungstest

#### 96-Loch Mikrotiterplatte

(GREINER)

#### 1%ige Hühnererythrozytenlösung

---

hergestellt aus dreimal mit NaCl-Lösung gewaschenen Erythrozyten von Hühnern aus dem FLI-Riems

#### Isotonische Kochsalzlösung pH 7.2-7.4

---

Natriumchlorid (NaCl)	42,5 g	(ROTH, Karlsruhe)
-----------------------	--------	-------------------

ad 5 L Aqua bidest

---

**APMV Hyperimmunseren aus Hühnern und Kaninchen sowie Virus aus dem Referenzmaterial des Friedrich-Loeffler-Institut - Insel Riems**

**Antigene**

---

APMV-1	Clone 30 NDV 96 1209634
pPMV-1	R 151/94 AF
APMV-2	Ich Calif Yuc 56
APMV-3	Parakeet Netherland 449/75 (P)
APMV-3	England (T)
APMV-6	8/85
APMV-7	dov/ Tn/4/75
APMV-8	Goose/Delawa/re/1053/76
APMV-9	Dom. Duck/NewYork 22/78

**Testseren**

---

APMV-1	NDV His Hu
pPMV-1	R 151/94 ch 13/99
APMV-2	His Hu 1983
APMV-3	1)449/75 His Hu 1983 (P)
APMV-3	2)His Hu 13 TV 6/99 (T)
APMV-5	Ka 1984
APMV-6	1984 His Ka
APMV-7	His 1984 Ka 5
APMV-8	TV 5/91 Hu 53 30908
APMV-9	TV 9/97 1435 His

---

### **3.3 UNTERSUCHUNGSMETHODEN**

#### **3.3.1 Nachweis von Virusgenom – RRT-PCR**

##### **3.3.1.1 Aufbereitung des Organmaterials**

Um die potentiell in den Organen vorhandene Virus RNA zu gewinnen, wurden zunächst Organstücke von den Nieren der Ringeltauben von jeweils ca. 30 mg Gewicht (Stecknadelkopfgröße), unter sterilen Bedingungen mit 400 µl RL-Puffer und einer sterilen Edelstahlkugel, in ein 2 ml Eppendorf Gefäß gegeben. Es wurde nach jedem siebenten Organ eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Gewebe mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen zu detektieren. Anschließend wurde das Gewebe zwei min bei 30 r/s in einem QiaShredder (QIAGEN, Hilden) mechanisch zerkleinert. Hiernach wurden die Proben bei -80 °C gelagert, bis sie der RNA Extraktion zugeführt werden konnten. Nach dem Auftauen und der Zentrifugation der Proben wurde aus dem Überstand mittels eines Hamilton MICROLAB STAR® eine automatische RNA-Extraktion per Silikamembrantechnologie durchgeführt. Die im 96-Loch Plattenformat extrahierte RNA wurde mit AlumaSeal® abgeklebt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Bearbeitung der extrahierten RNA erfolgte parallel mit den zwei durchgeführten PCR Protokollen, um eine durch wiederholtes Einfrieren und Tauen verursachte Degradation der RNA zu vermeiden.

##### **3.3.1.2 M-Gen-spezifische RRT-PCR**

Als M-Gen-spezifische RRT-PCR wurde das validierte und USDA-zertifizierte Protokoll nach WISE et al. (2004) angewendet, wobei in Abweichung zum publizierten Protokoll kein RNase Inhibitor eingesetzt wurde.

Bei dieser Real Time RT-PCR wird der Abschnitt der Virus RNA, der für das Matrixprotein codiert, amplifiziert. Zur Durchführung wurde das One-Step Protokoll unter Zuhilfenahme des One-step RT-PCR Kits angewandt. Der Mastermix mit einem

Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe, setzte sich wie beschrieben zusammen (siehe 3.2.1.1). Die Primer sind in der Lage ein 184 bp großes Fragment zu amplifizieren. Die Sonde von 24 Basenpaaren Länge ist am 5' Ende mit FAM als Fluorophore und am 3' Ende mit BHQ 1 als Quencher markiert. Es wurde hieraus ein Primer-Sonden-Gemisch aus den Primern M+ 4100 und M- 4220 in Konzentrationen von jeweils 10 pmol / µl sowie der Sonde M+ 4169 in einer Konzentration von 6 pmol / µl in 0,1 x TE-Puffer hergestellt und dem Mastermix als NDV-M-Mix-Fam zugeführt.

Der Mastermix wurde in einer 96-Loch RRT-PCR Platte in Aliquots von 20 µl vorgelegt, anschließend wurden 5 µl Proben-RNA pro Ansatz zugegeben. Anschließen wurden die Aliquots zugedeckelt. Als Positivkontrolle diente RNA des APMV-1 Stammes 599, die auf einen cT Wert von 30 eingestellt war. Die Durchführung der RRT-PCR wurde auf einem Stratagene Mx3000P Real-Time Cycler nach dem in Tab. 5 angeführten Temperaturprofil vorgenommen.

**Tab. 5:**  
**Temperaturprofil der RRT-PCR Reaktion**

Durchgeführter Schritt	Zeit	Temperatur	
Reverse Transkription	30 min	50 °C	
Aktivierung der Taq Polymerase	15 min	95 °C	
Denaturierung	10 sec	94 °C	40 Zyklen
Anlagerung	30 sec	52 °C	
Finale Elongation	10 sec	72 °C	

Zur Fluoreszenzmessung wurde ein Filterset mit einer Exzitationswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge 516 nm (FAM-Filter set) eingesetzt. Die Auswertung wurde mit den Einstellungen „Amplification based threshold“, „Adaptive baseline“ sowie „Moving average smoothing“ vorgenommen



### 3.3.1.3 NP-Gen spezifische RRT-PCR

Zusätzlich zum oben genannten PCR-Protokoll wurde eine Methode genutzt, die das für NP-Protein kodierende Gen als Zielgen nutzt (WÄCKERLIN, 2009). Die RRT-PCR wurde als One-Step PCR unter Zuhilfenahme des Quantitec Probe RT-PCR Kits durchgeführt. Der Mastermix für den PCR Ansatz setzt sich wie in 2.1.2.2 beschrieben zusammen.

Der Mastermix wurde in einer 96-Loch Platte in je 20 µl vorgelegt, anschließend wurden pro Vertiefung 5 µl Proben RNA hinzugefügt. Als Positivkontrolle diente hier ebenfalls RNA des APMV-1 Stammes 599. Die Amplifikation wurde über 40 Zyklen mit dem unten aufgeführten Temperaturprofil durchgeführt (Tab. 6). Es wurde ein Filterset mit einer Exzitationswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge 516 nm (FAM-Filter set) eingesetzt.

**Tab. 6:**

**Temperaturprofil der RRT-PCR auf dem NP-Proteingen**

Durchgeführter Schritt	Zeit	Temperatur	
Reverse Transkription	30 min	50°C	
Aktivierung der Taq Polymerase	15 min	95°C	
Denaturierung	30 sec	95°C	40 Zyklen
Annealing	30 sec	55°C	
Finale Elongation	30 sec	72°C	

Die Ergebnisse der RRT-PCR Protokolle wurde mit den Softwareeinstellungen „Amplification Based Threshold“, „Adaptive Baseline“ sowie „Moving Average Smoothing“ vorgenommen.

### **3.3.2 NACHWEIS VON VIRUSSPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN**

#### **3.3.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Sämtliche gewonnene Ringeltaubenseren wurden im ELISA auf APMV-1 spezifische Antikörper im Doppelansatz untersucht. Kontrollen mit Positivserum, Negativserum sowie Konjugatkontrollen ohne die Zugabe von Serum wurden in jedem ELISA mitgeführt. Zunächst wurde die Antigenverdünnung zu 50 µl pro Vertiefung auf die 96 Loch ELISA-Platten verbracht, die dann über Nacht bei Raumtemperatur mit Folie abgedeckt zur Inkubation stehen gelassen wurden. Am nächsten Morgen wurden die Platten abgeschüttet und ein Waschschrift durchgeführt. Dafür wurden die Platten abgeschüttet und die Vertiefungen drei Mal mit 300 µl Waschpuffer aufgefüllt und anschließend wieder abgeschüttet und ausgeklopft. Die noch freien Bindungskapazitäten auf den ELISA-Platten wurden anschließend eine Stunde lang mit Blockpuffer, zu 100µl pro well, geblockt. Es folgte wieder ein Waschschrift, bevor als erster Antikörper 50 µl der Serumverdünnung (1:400 in Blockpuffer) der zu testenden Seren, je im Doppelansatz in die Vertiefungen gegeben wurde. Als Kontrollen wurden ein positives und ein negatives Serum in gleicher Verdünnung, sowie reiner Blockpuffer als Konjugatkontrolle mitgeführt. Nach dreißig minütiger Inkubationszeit folgte erneut ein Waschschrift, bevor zu 50 µl in jede Vertiefung als zweiter Antikörper ein im Kaninchen hergestelltes, gegen Tauben IgY gerichtetes Serum (1:1000) gegeben wurde. Nach dreißig Minuten Inkubation wurde erneut gewaschen und ein dritter, gegen Kaninchen IgG gerichteter, enzymmarkierter Antikörper (1:4000) mit 50 µl für weitere dreißig Minuten in jede Vertiefungen gegeben. Nach einem folgenden Waschschrift wurde nun 100µl Substrat pro Vertiefung für 10 Minuten in Dunkelheit auf den Platten belassen. Die Reaktion wurde anschließend mit 50µl 2M Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt. Bei der Präsenz von Antikörpern in den Testseren kam es durch enzymatische Reaktion zu einer Farbentwicklung der Flüssigkeit in den Vertiefungen von klar zu Gelb-Orange. Die optische Dichte(OD) der Proben wurde mittels ELISA-Messgerät (Sunrise, Tecan) bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650

nm gemessen. Für eine einheitliche Bewertung der Tests wurde der S/P Wert mit folgender Formel errechnet:

$$S/P = (OD \text{ Testserum} - OD \text{ Konjugatkontrolle}) / (OD \text{ Positivserum} - OD \text{ Konjugatkontrolle})$$

Hiermit wurden die Ergebnisse der Testseren mit dem APMV-1 positiven Taubenserum in Beziehung gesetzt.

### **3.3.2.2 Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS Page wurde nach LAEMMLI et al (1970) durchgeführt. Hierfür wurde die Gelkammer Perfect Blue 10\*10 cm (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen), benutzt. Zunächst wurde ein 10%iges Trenngel gegossen und mit Ethanol überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach einer Stunde Polymerisation wurde über das Trenngel das Sammelgel gegossen und auf jeder Seite der Gelkammer ein präparativer Kamm eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten Polymerisation wurden die Kämmen entfernt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. In die kleinen Taschen wurden jeweils 5 µl Marker, in die großen Taschen je 3\*25 µl der Antigenverdünnung eingesetzt. Nun wurden die Antigenproteine mittels Elektrophorese in einem 55 minütigen Lauf bei 80 mAs, 300 V und 150 W. aufgetrennt.

### **3.3.2.3 Färbung eines Polyacrylamidgels**

Im Polyacrylamidgel wurde mittels Coomassie-Färbung die aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht. Hierfür wurde das Gel über Nacht in einer Coomassie-Lösung inkubiert, und anschließend 60 min oder bis zum kompletten Entfärben des Hintergrundes bei Erhaltung der Bandenfärbung in Entfärberlösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel zwischen zwei Cellophanblättern (Roth, Karlsruhe) getrocknet.

### 3.3.2.4 Western Blot (WB)

Die in der SDS Page aufgetrennten Virusproteine und der Marker wurden in einem Semi Dry Blotter (PEQLAB, Erlangen) von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurden ein 10 x 10 cm großes Filterpapier, die Membran, das Gel und nochmals ein Filterpapier jeweils in Blotpuffer getränkt und übereinander gelegt. Dann wurden die Proteine für 60 Minuten bei 300 mAs, 14 V und 300 W transferiert. Um das Ergebnis des Blottens zu überprüfen wurden die Membranen anschließend fünf Minuten mit Ponceau Rot gefärbt womit die Proteinbanden sichtbar gemacht wurden. Anschließend wurden die Membranen so lange mit Wasser gewaschen, bis dieses klar blieb. Danach wurden die Membranen eine Stunde lang mit Blockpuffer geblockt. Nach dem Anbringen von Klebestreifen mit fortlaufender Buchstabenkennzeichnung am unteren und oberen Rand der Membranen, wurden diese entsprechend der Buchstabenbreite in 2-3 mm breite Streifen geschnitten, so dass jeder Streifen über einen Buchstaben zu identifizieren war. Diese Streifen wurden bei -20°C bis zu ihrem Einsatz gelagert. Für die Untersuchung wurden die Teststreifen einzeln in je eine Unterteilung einer Kunststoffwanne gegeben und zur besseren Inkubation auf einen Schüttler gestellt. Es wurde je ein Teststreifen über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit 1,5 ml des Testserums (1: 800 in Blockpuffer) inkubiert. Positiv- und Negativ- sowie Konjugatkontrollen ohne den Einsatz von Testserum wurden mitgeführt. Am nächsten Tag wurden die Streifen 3 x 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend 1,5 ml gegen Tauben IgG gerichteter Antikörper (1:1000) aus Kaninchen auf die Streifen gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Streifen mit einem dritten, gegen Kaninchen IgG gerichteten, Enzym markierten Antikörper (1:4000) 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Teststreifen für 5 Minuten mit dem Substrat bedeckt und anschließend die Enzymreaktion mittels Röntgenfilm bei einer Belichtungszeit von 20 Sekunden dokumentiert.

Die Röntgenfilme wurden von Hand entwickelt. Dafür wurden sie 60 sek. in Entwicklungsflüssigkeit getaucht, danach in klarem Wasser gewaschen, 60 sek.

fixiert und anschließend unter fließendem Wasser gewaschen. Nach dem die Filme getrocknet waren konnten sie beurteilt werden.

### **3.3.2.5 Hämagglutinationshemmungstest (HAH)**

Der HAH wurde nach den Vorgaben der EU-Richtlinie 92/66/EWG folgendermaßen durchgeführt:

#### **Einstellen der Virusverdünnung auf 4 hämagglutinierende Einheiten (HAE):**

Zunächst wurde ein Hämagglutinations (HA)-Vortest zur Einstellung der Antigen-Verbrauchsverdünnung auf 4 hämagglutinierende Einheiten (HAE) durchgeführt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe des Antigens im Doppelansatz angelegt und anschließend getestet.

Hierfür wurden 25 µl 0,9% NaCl-Lösung (pH 7,0–7,4) in jede Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte vorgelegt. Danach wurden für jede Testreihe 25µl des Antigens in die erste Vertiefung gegeben. Durch Transfer von je 25 µl von einer in die nächste Vertiefung der jeweiligen Reihe wurden Verdünnungsstufen im Logarithmus zur Basis 2 hergestellt. Die unterste Reihe der Platte wurde dabei ausgespart und diente der Erythrozytenkontrolle.

Nach Zugabe von 1%iger Hühnererythrozytenlösung in alle Vertiefungen, wurde die die Platte 30 Minuten bei RT zur Inkubation stehen gelassen.

Um das Ergebnis ablesen zu können, wurden die Platten in einem Winkel von 45° gehalten, so dass nicht agglutinierte Erythrozyten der Schwerkraft folgend nach unten fließen konnten. Als Hämagglutination wurde gewertet, wenn die Erythrozyten nicht oder im Vergleich zur Erythrozytenkontrolle nur stark verzögert abliefen.

Die höchste Verdünnung, bei der noch eine Agglutination festgestellt wurde enthielt 1 HAE in 25µl. Die Gebrauchsverdünnung sollte 4 HAE enthalten, das heißt sie musste vier mal so konzentriert sein wie die Verdünnung, die 1 HAE enthielt. Es wurde nun eine Virusverdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung (pH 7,0–7,4) hergestellt, in der die errechneten 4 HAE Antigen enthalten waren. In einen erneuten HA Test wurde kontrolliert, ob tatsächlich eine Agglutination bis zu einer Verdünnung von

einschließlich 1:4 stattfand. War dies der Fall, konnte mit dem HAH Test begonnen werden, ansonsten wurde das Virus neu eingestellt.

### **Untersuchung der Seren auf spezifische Antikörper**

Beim anschließenden HAH zur Untersuchung der Seren auf Antikörper, die mit dem Testvirus reagieren, wurden die Seren im Doppelansatzes getestet.

Wie beim HA Test wurden zunächst 25 µl einer 0,9% NaCl-Lösung (pH 7,0–7,4) in jede Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte vorgelegt. Ebenfalls in Log<sub>2</sub> Stufen wurde eine Verdünnungsreihe mit den zu testenden Seren angelegt. Dann wurde das auf 4 HAE eingestellte Antigen in 25µl pro Vertiefung hinzugegeben. Nach 45 minütiger Inkubation bei RT wurden 25 µl einer 1% Hühnererythrozytensuspension pro Vertiefung hinzugegeben. Eine weitere Inkubationzeit von 30 min bei RT wurde abgewartet. Als Kontrollen wurden eine Erythrozytenkontrolle (ohne Serum, ohne Antigen), sowie eine Serumkontrolle (ohne Antigen) mitgeführt, die eine Autoagglutination der Erythrozyten bzw. eine unspezifische Agglutination durch das eingesetzte Serum ausschließen sollen. Das Ablesen des Tests erfolgte wieder in einem Winkel von 45°. Als Hämagglutinationshemmung wurde gewertet, wenn die Erythrozyten ebenso schnell abliefen wie die in der Erythrozytenkontrolle.

Der Titer ergibt sich aus der letzten Serumverdünnung, bei der die Agglutination noch vollständig gehemmt wird und wird in log<sub>2</sub> Stufen angegeben. Demnach entspricht der Titer 1 einer Serumverdünnung von 1:2 und 11 einer Verdünnung von 1:2048

### **3.4 STATISTISCHE BEWERTUNG**

Die statistische Bewertung der Testergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Hendrik Wilking aus dem Friedrich-Loeffler-Institut Wusterhausen durchgeführt.

#### **3.4.1 Signifikanz**

Um zu beurteilen, ob Ergebnisse einem kausalen Zusammenhang entsprechen oder ob sie zufällig auftreten, wird die Signifikanz errechnet. Liegt dabei der Wert  $p < 0,05$ , wird ein Ergebnis als Signifikant bezeichnet und Wahrscheinlichkeit, dass die Ergebnisse zufällig zustande gekommen sind, liegt bei 5%. Hier wurde der Wilcoxon Rangsummentest für die Berechnung der Signifikanz eingesetzt.

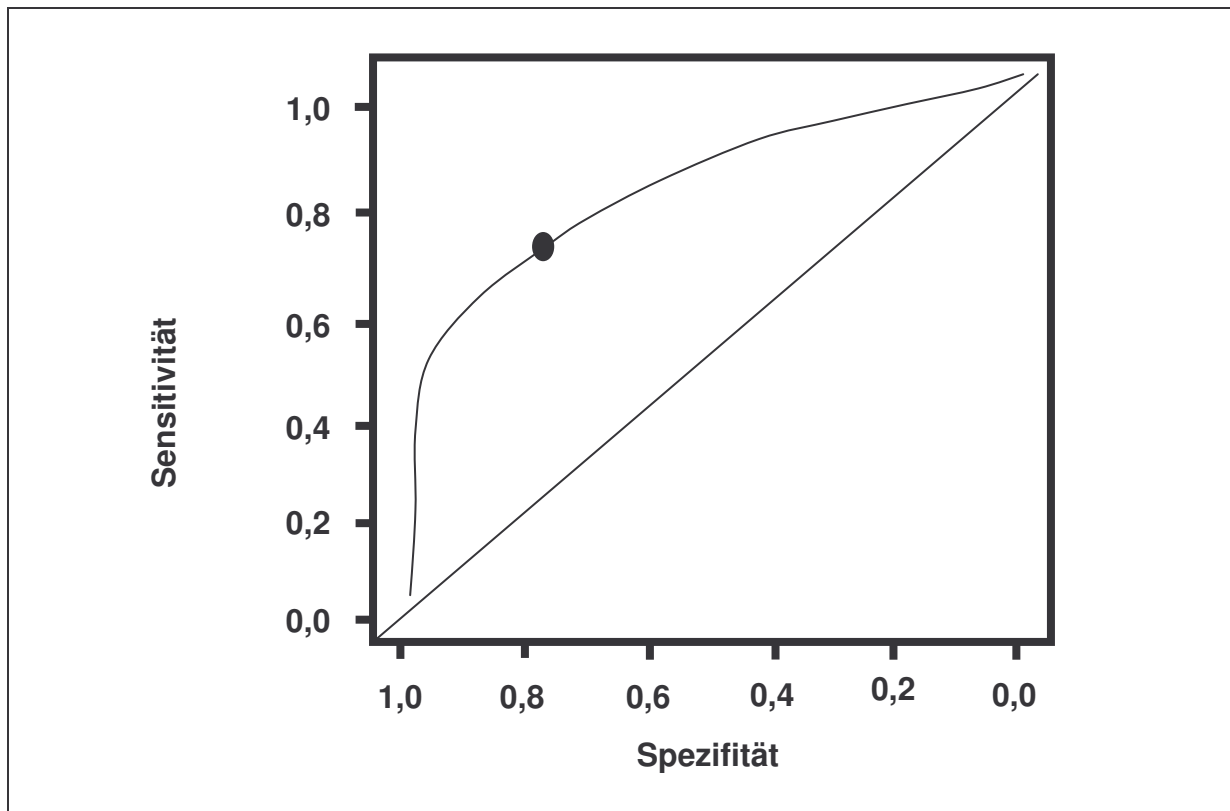
#### **3.4.2 Sensitivität und Spezifität**

Für die Bewertung der Testgenauigkeit des ELISA wurden die Sensitivität und die Spezifität der Ergebnisse bei der Wahl einer bestimmten Ausschlussgrenze ermittelt. Hierbei ist von Bedeutung, ob der ELISA positive Seren erkennt (richtig positiv  $rp$ ), nicht erkennt (falsch negativ  $fn$ ) bzw negative Seren erkennt (richtig negativ  $rn$ ) oder nicht erkennt (falsch positiv  $fp$ ). Die Sensitivität des Tests ergibt sich aus der Formel ( $rp/(rp+fn)$ ) und beschreibt den Anteil der richtig erkannten positiven Seren an allen positiven. Die Spezifität ergibt sich aus der Formel ( $rn/(rn+fp)$ ) und beschreibt den Anteil der richtig negativ erkannten Seren von allen negativen.

#### **3.4.3 ROC-Analyse**

In ROC-Kurven werden die Wertepaare von Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Test für alle möglichen Cut-off Werte innerhalb des Messbereichs

aufgetragen (Abb. 7) Entlang der Abzisse sind hierbei die Werte der Spezifität, entlang der Ordinate die Werte der Sensitivität aufgetragen. Der Punkt, der sich dabei am meisten dem linken oberen Eck der Grafik nähert, ist als Cut-off Wert anzusehen, der die größte Testgenauigkeit liefert. Die entstandene Kurve begrenzt einen Bereich zu einer Diagonalen der Grafik, die als area under the curve (AUC) bezeichnet wird (Abb. 8). Ihr Wert kann zwischen 0,5 und 1 liegen und gibt Aussage über die Qualität des Testes. Je größer die AUC, desto höher ist die Trennschärfe des Tests.

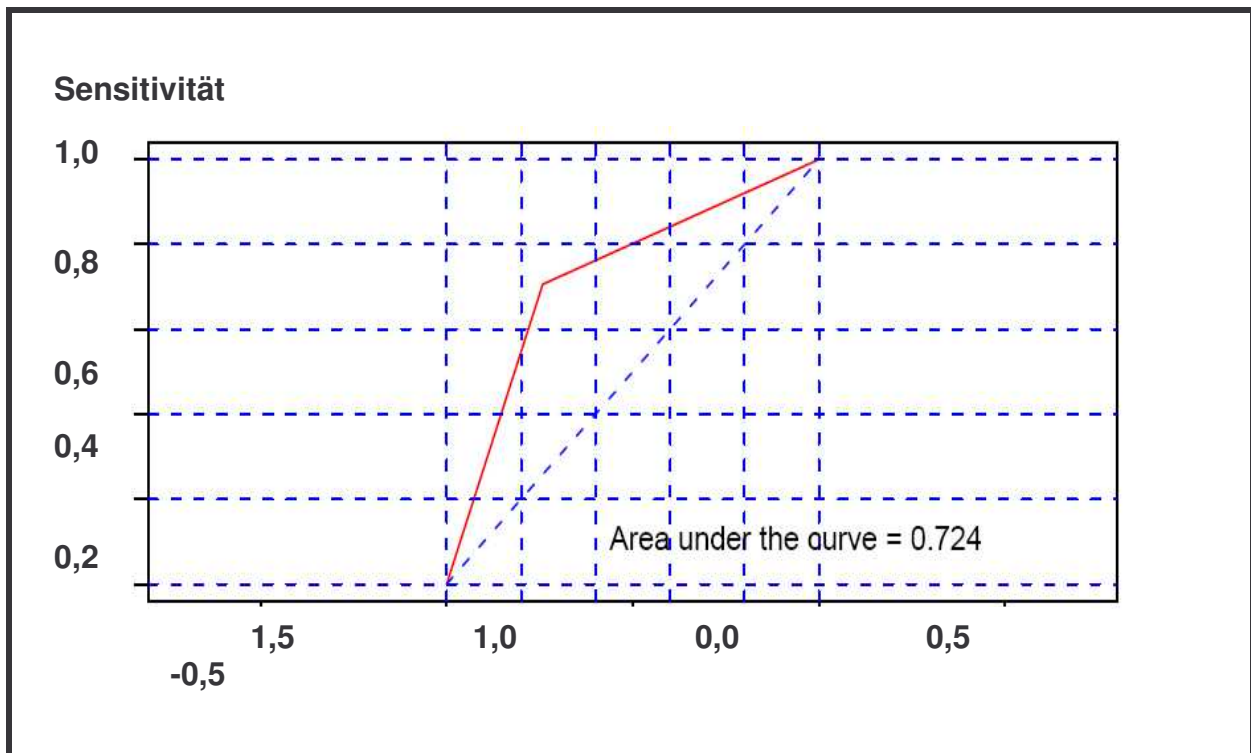


**Abb. 7:**

### **Darstellung einer ROC-Analyse**

In Abhängigkeit der Sensitivität und Spezifität, die durch einen bestimmten Cut-off erzielt werden, werden die Punkte in die Graphik eingetragen. Als bester Cut-off Wert wird derjenige Wert gewählt, der sich dem linken oberen Eck der Graphik am meisten nähert.





**Abb. 8:**

**Darstellung einer „area under the curve“ in der ROC-Analyse**

Dargestellt ist als AUC bezeichnete Fläche, die sich zwischen der Diagonalen und der durch den gewählten Cut off ergebene Kurve ergibt. Die Größe der Fläche gilt als Maß für die Testgenauigkeit bei diesem Cut-off und kann zwischen 0,5 und 1 liegen. Je größer dieser Wert, desto sicherer ist der Test.

(Quelle: HENDRIK WILKING aus dem Friedrich-Loeffler-Institut Wusterhausen)

**3.4.4 Konfidenzintervall**

Das Konfidenzintervall schließt einen Bereich um den geschätzten Wert eines Parameters ein, der mit einer festgelegten Wahrscheinlichkeit die wahre Lage des Parameters trifft. Somit gibt er die Wahrscheinlichkeit für die Wahrheit einer angegebenen Größe an.



## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 SEKTION

Für die Untersuchung einer Ringeltaubenpopulation auf das Vorkommen von APMV-Infektionen wurden Tauben herangezogen, die während der Jagd erlegt wurden. Die insgesamt 241 beprobten Vögel stammten aus dem Raum Krefeld (NRW) und wurden in den Jahren 2007 und 2008 während der Monate Juli–Oktober bzw. Juli-September geschossen (Tab. 7). In den beprobten Schwärmen verhielten sich alle Tauben lebhaft und aufmerksam, nahmen Nahrung auf und waren flugfähig. Bei der Adspektion der geschossenen Vögel erschienen sämtliche Exemplare, abgesehen von Schussverletzungen und dadurch bedingten Blutungen, mit sauberer, geschlossener Federdecke, klaren Augen und trockenen Nasenöffnungen. Jungtauben konnten anhand ihres im Vergleich zu den Alttauben bräunlich erscheinenden Gefieders und der geringer ausgeprägten Gonadenentwicklung identifiziert werden. Des Weiteren wichen sie in Größe und Gewicht sichtlich von den erwachsenen Artgenossen ab und waren unter anderem dadurch gut abzugrenzen. Bei fünf Tauben wurden während der Sektion weiße, stechnadelkopfgroße, knotige Veränderungen an der Leber festgestellt. Alle anderen Tauben wiesen keinerlei makroskopisch erkennbare, pathologische Veränderungen der Organe auf. Bei 15 Tauben fiel ein Befall mit Bandwürmern auf, die auf Grund von Schussverletzungen des Darmes bereits ausgewandert waren und frei zwischen den Darmschlingen lagen.

Tab. 7:

**Beschreibung der Ringeltaubenstichprobe**

Einteilungskriterien	Anzahl			Gewicht
	2007	2008	Gesamt	
<b>Männliche Tauben</b>	69	45	114 (47%)	520 ±29g
<b>Weibliche Tauben</b>	65	62	127 (53%)	526 ±29g
<b>Jungvögel</b>	9	4	13 (5%)	356 ±26g
<b>Gesamtzahl</b>	<b>134</b>	<b>107</b>	<b>241 (100%)</b>	

## 4.2 VIROLOGISCHER NACHWEIS – RRT - PCR

Es wurden Gewebeproben der Nieren sämtlicher Ringeltauben mittels real-time-RT-PCR auf das M- und das NP-Proteingen hin untersucht. In sämtlichen Proben ließ sich RNA, spezifisch für APMV-1, nicht nachweisen.

## 4.3 SEROLOGISCHER NACHWEIS

### 4.3.1 Hämagglutinationshemmungstest

Die gewonnenen Seren der Ringeltauben wurden mittels HAH auf APMV-1 spezifische Antikörper untersucht (Tab. 8). Nur ein Serum reagierte im HAH deutlich positiv. Während es mit dem PPMV-1 Antigen eine Titerstufe von 5 aufwies, war mit dem Antigen APMV-1 LaSota eine Hemmung bis zur Titerstufe 6 festzustellen. Des Weiteren kam es mit APMV-1 LaSota bei 35 Seren zu einer geringen Hemmung der Hämagglutination bis zu drei Titerstufen. Fünf dieser Seren reagierten mit PPMV-1 bis zur Titerstufe 1 positiv. Die gleichen Seren wiesen mit dem APMV-1 LaSota Antigen zweimal eine Hemmung bis zur ersten, zwei bis zur zweiten und eins bis zur dritten Titerstufe auf.

Das mitgeführte PPMV-1 spezifische Referenzserum reagierte mit dem homologen PPMV-1 Antigen bis zur elften und mit dem heterologen APMV-1 LaSota Antigen bis

zur achten Titerstufe positiv. Analog dazu reagierte ein PPMV-1 positives Serum aus einer Taube mit PPMV-1 bis zur Titerstufe 8 positiv, während es mit APMV-1 LaSota bis zur Titerstufe 5 die Hämagglutination hemmte.

Reziprok hierzu rief ein mitgeführtes ND Referenzserum mit APMV-1 LaSota eine Hemmung bis zur neunten und mit PPMV-1 eine Hemmung bis zur siebten Titerstufe hervor.

Nach der Richtlinie 92/66/EWG, die eine Reaktion >3 als seropositiv einordnet, konnten mit dem APMV-1 LaSota Antigen vier Ringeltaubenseren positiv und mit dem PPMV-1 Antigen ein Serum positiv beurteilt werden. Um die HAH Ergebnisse und dabei insbesondere die Spezifität der niedrigen Serumantikörpertiter zu überprüfen, wurden weitere enzymverstärkte serologische Untersuchungen angeschlossen.

**Tab. 8:**

**Aktivität der Ringeltaubenseren im Hämagglutinationshemmungstest**

Antigen	Titer im HAH							APMV-1 seropositiv <sup>1</sup>
	>1	1	2	3	4	5	6	
APMV-1 (LaSota)	205 <sup>2</sup>	16	16	3			1	4 (16%)
PPMV-1 (R151/94)	235 <sup>2</sup>	5				1		1 (0,4%)

<sup>1</sup> Seropositiv nach der Richtlinie 92/66/EWG:>3

<sup>2</sup> Anzahl der reagierenden Seren in den korrespondierenden Titerstufen

**4.3.2 ELISA zur Untersuchung von Ringeltauben auf APMV-1**

Zur Überprüfung der Arbeitskonzentration der Seren im ELISA wurde eine Verdünnungsreihe eines definiert APMV-1 positiven und negativen Taubenserums angelegt (Abb. 9). Das positive Taubenserum erreichte in der geringsten Verdünnung (1:50) einen OD-Wert von annähernd 1 (0,98). Bis zur 6. Verdünnungsstufe (1:1600), fielen die OD-Werte jeweils weniger als 30% ab, zwischen der 7. und 10. Verdünnungsstufe (1:3200, 1:25600), betrug die Reduktion zum vorherigen Wert 38-58%, danach sanken die OD-Werte wieder langsamer ab bis der Wert schließlich bei

der 14. Verdünnungsstufe (1:2048) bei 0 lag. Der OD-Wert des Negativserums lag in der stärksten Konzentration (1:50) bei 0,24 und sank bis zur 7. Verdünnungsstufe (1:3200) recht stetig auf den Wert 0. Der Quotient der gemessenen OD-Werte des positiven und des negativen Serums ließ als P/S Wert ausgedrückt die Differenz zwischen der Reaktivität beider Seren erkennen. Dieser Wert nahm bis zur 6. Verdünnungsstufe (1:1600) zu und danach wieder ab. Bei einer Serumverdünnung von 1:400 gab das positive Serum mit einem OD-Wert von 0,71 ein deutlich messbares Signal welches um 13,7x höher lag als das des Negativserums. In diesem Bereich der Serumverdünnung war eine Unterscheidung zwischen dem positiven und dem negativen Serum gut möglich, eine vollständige Sättigung wurde durch das positive Serum noch nicht erzielt, so dass noch höher-titrige Seren als das eingesetzte positive Kontrollserum detektiert werden konnten. Diese Verdünnung wurde gewählt um alle 241 Ringeltaubenserum zu testen. Die dabei gemessenen OD-Werte wurden jeweils in Relation zu einem positiven Referenzserum gesetzt (S/P-Wert).

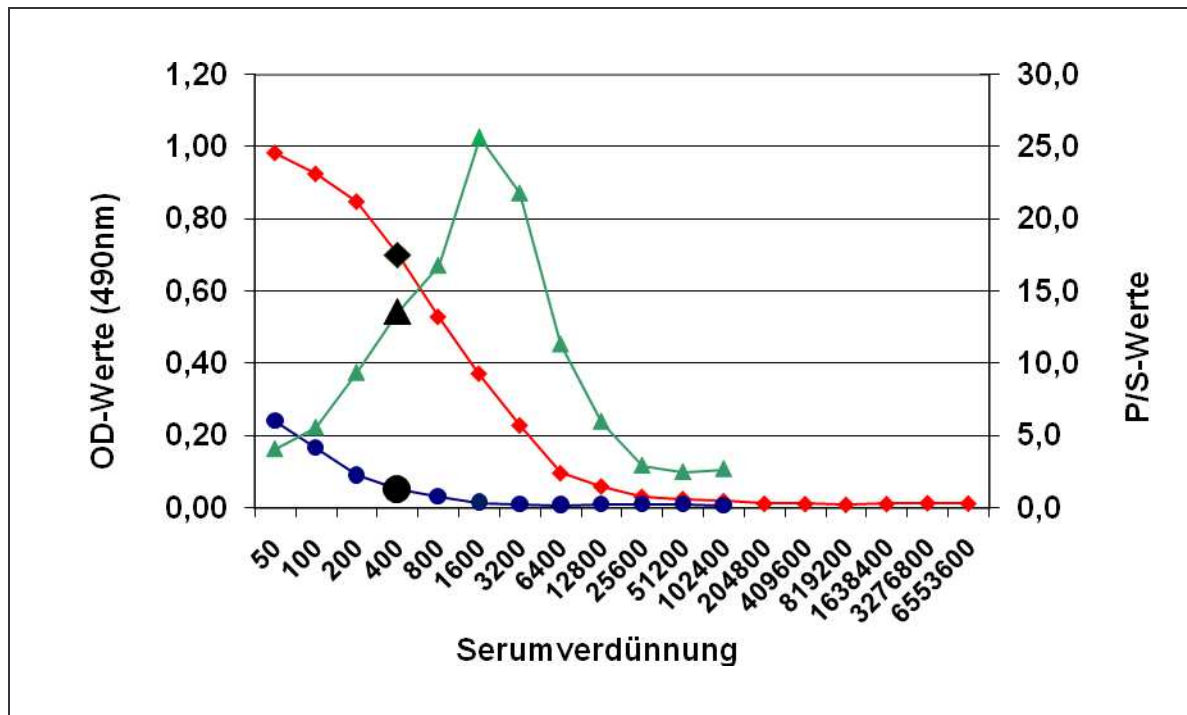


Abb. 9:

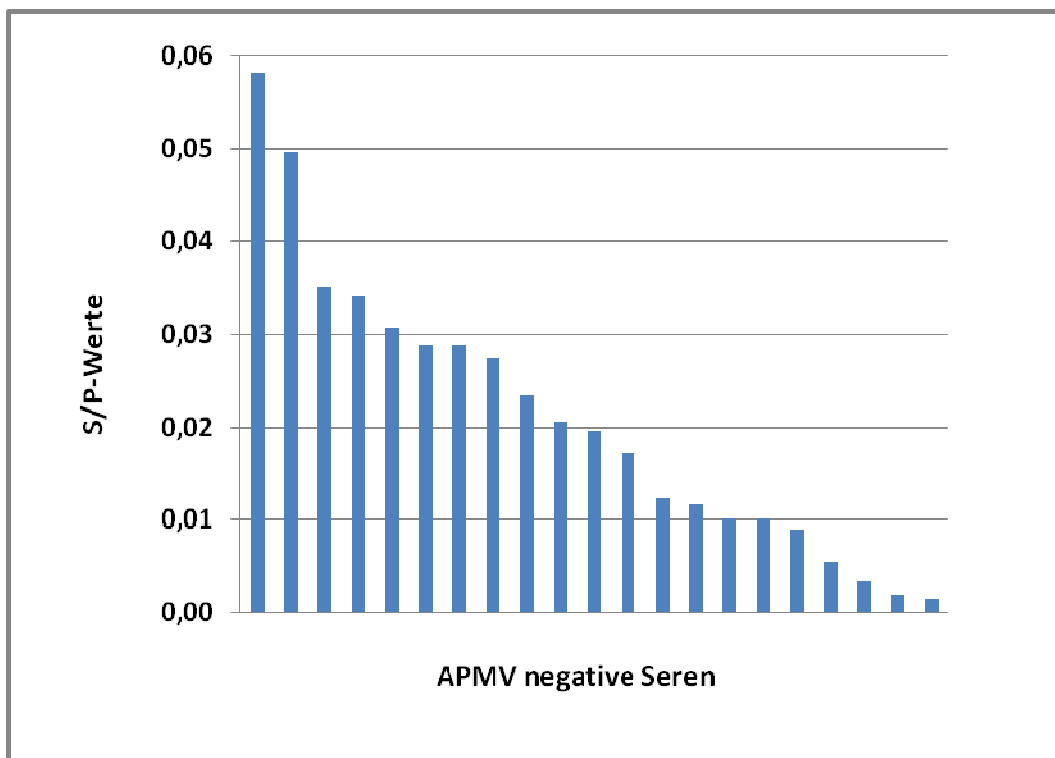
### ELISA-Reaktivität in Abhängigkeit von der Serumkonzentration

Dargestellt ist die Reaktivität eines definiert PPMV-1 positiven Taubenserums (♦) und eines definiert APMV-negativen Taubenserums (●) im ELISA, in Abhängigkeit zur Serumkonzentration. Der Abstand der Reaktionen beider Seren wurde als P/S- Wert eingetragen (▲). Bei der gewählten Verdünnung für die spätere Untersuchung der Ringeltaubenserem von 1:400, sind die Symbole vergrößert und schwarz hinterlegt.

Um die Ergebnisse der Ringeltaubenserem im ELISA nach ihrem APMV-Serostatus in positiv oder negativ einteilen zu können, wurden 21 definiert APMV-1 negative Taubenserem bei der gewählten Verdünnung von 1:400 getestet. Die gemessenen OD-Werte lagen in einem OD-Bereich von 0,03 bis 0,07. Die Werte wurden in Beziehung zu dem PPMV-1 positiven Kontrollserum gesetzt (S/P-Werte). Die S/P-Werte lagen hier zwischen 0,01 und 0,06 (Abb. 10) und fielen damit im Vergleich zum positiven Referenzserum sehr gering aus. Auf der Grundlage des arithmetischen Mittels der S/P Werte zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung wurde eine Ausschlussgrenze von 0,08 errechnet. Ab diesem Wert wurden die Ringeltaubenserem als positiv beurteilt.

Die getesteten Ringeltaubenseren fielen im Vergleich zu den negativen Referenzseren sehr hoch aus. Die ermittelten S/P-Werte lagen in einen Bereich zwischen 0 und 0,98, wobei die Hauptverteilung der S/P-Werte mit 122 Seren zwischen 0,08 und 0,3 lag. Von den Ringeltaubenseren fielen nur 19 mit ihrem S/P-Wert unter die gewählte Ausschlussgrenze von 0,08 und waren demnach als seronegativ zu beurteilen. Alle anderen Ergebnisse (222) lagen über diesem Wert und wurden als APMV-1 positiv beurteilt (Abb. 11).

Die hohe Anzahl der ELISA-positiven Ergebnisse stand in extremen Gegensatz zu der geringen Anzahl der im HAH ermittelten APMV-1 positiven Seren. Es war nicht auszuschließen, dass die Seren auf Grund von speziesspezifischen Eigenschaften der Seren. und/oder den nicht optimalen Bedingungen bei der Serumgewinnung, hohe unspezifische Hintergrundreaktion aufwiesen. Daher wurde zur Absicherung der Ergebnisse als weiteres Testverfahren ein Western Blot angeschlossen.

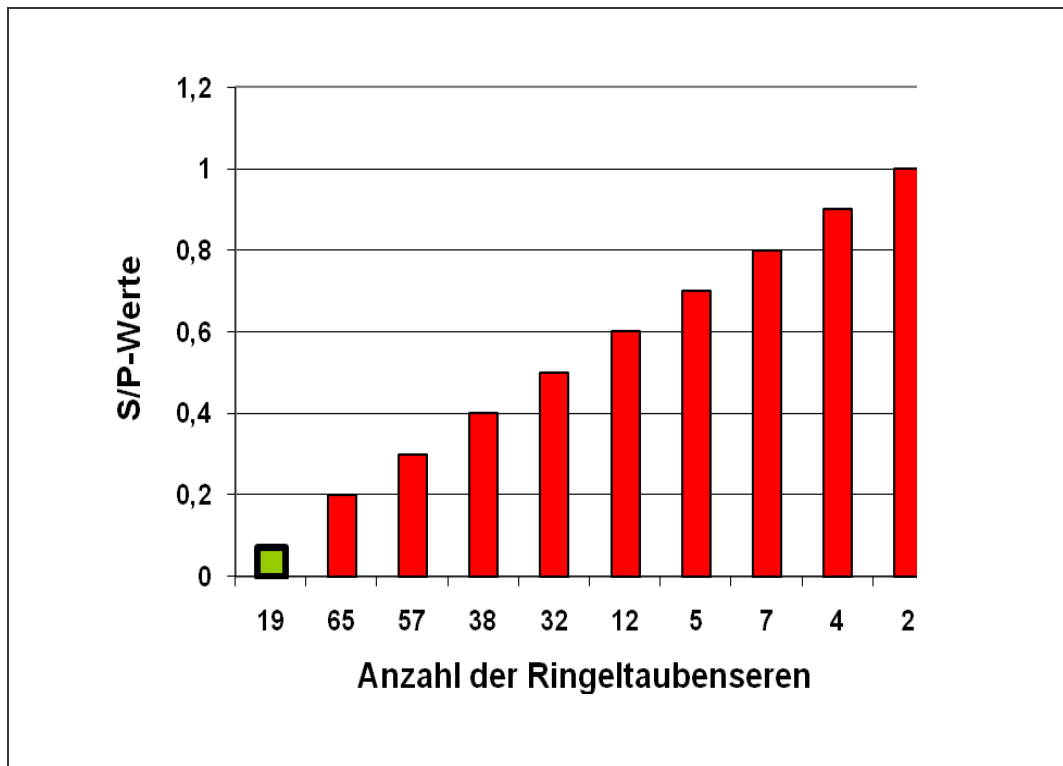


**Abb. 10:**

**ELISA-Reaktivität bei definiert APMV-negativen Taubenseren**

Getestet wurden Seren von 21 SPF-Tauben bei einer Verdünnung von 1:400 im ELISA. Dargestellt ist das Verhältnis der OD Werte dieser Negativseren in Bezug zu dem positive Referenzserum, ausgedrückt als S/P Wert.





**Abb. 11**

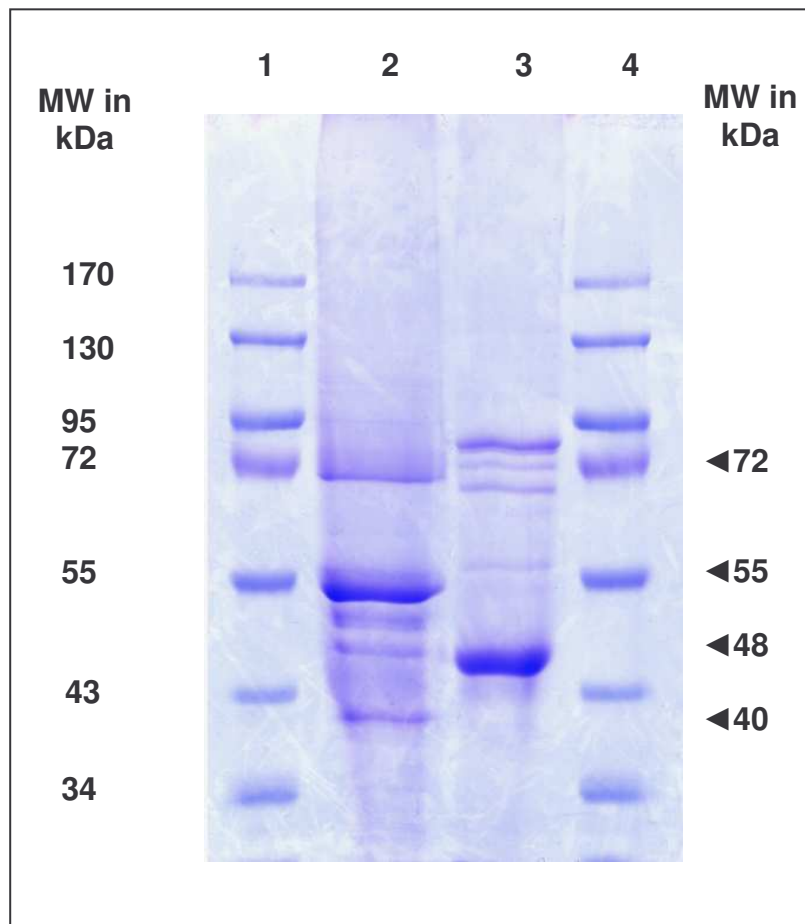
**ELISA-Reaktivität der Ringeltaubenserens**

Ringeltaubenserens (n=241) wurden bei einer Verdünnung von 1:400 im ELISA getestet. Dargestellt sind die Spanne und die Häufigkeit der erreichten S/P-Werte. Hauptverteilung der S/P-Werte lag zwischen 0,08 und 0,3. Nach Berechnung Ausschlussgrenze von 0,08 fielen 122 Seren (92%) der 241 ELISA getesteten Ringeltaubenserens in den positiven Bereich. Es erreichten 19 (8%) der Seren S/P-Werte zwischen 0 und 0,8 und fielen damit in den negativen Bereich.

### 4.3.3. SDS-Page und Western Blot

#### 4.3.3.1. Darstellung von Virusproteinen nach Auftrennung in der SDS-PAGE

Die für die WB-Untersuchungen präparierte APMV-1 Aufreinigung wies ein Proteinmuster auf, welches deutlich von den nachweisbaren Proteinen der unbeimpften Amnioallantoisflüssigkeit (AAF) abzugrenzen war (Abb.12).



**Abb. 12:**

**Darstellung der Proteine von APMV-1 und unbeimpfter Amnioallantoisflüssigkeit im Coomassie gefärbten Gel**

Dargestellt sind die Proteine von 5,2 µg APMV-1 (2) bzw. 25 µl Amnioallantoisflüssigkeit (3) pro Spur, die in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt wurden. Nach Färbung mit Coomassie erkannte man ein unterschiedliches

Bandenmuster hinsichtlich Anzahl, Intensität und Position der Proteinbanden. Anhand der mitgeführten Marker (**1+2**) ließ sich das Molekulargewicht dieser Proteinbanden errechnen.

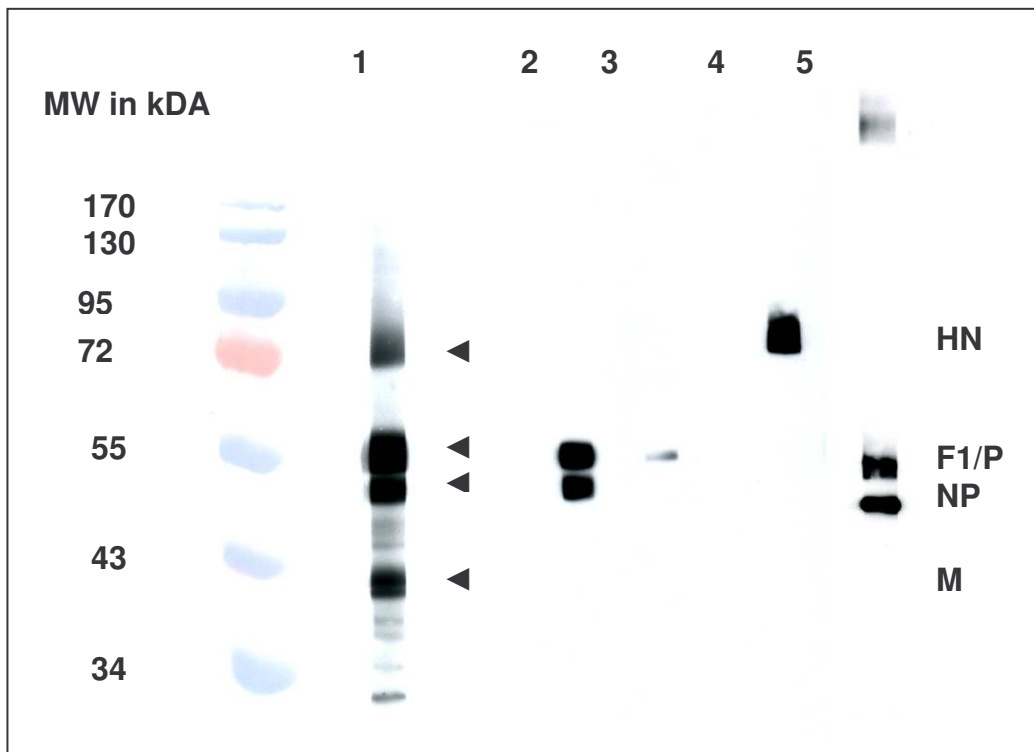
Basierend auf dem Größenvergleich zu einem mitgeführten Marker, dominierte von den Proteinbanden der APMV-1 Aufreinigung diejenige bei 55 kDa. Darüberhinaus zeigten sich Proteinbanden im Bereich von etwa 72, 52, 50 und 40 kDa.

Bei den Proteinen der Allantoisflüssigkeit war kein Protein exakt auf der gleichen Höhe der Lauffront wie bei der Virusaufreinigung sichtbar. Eine relativ starke Bande ergab sich im Bereich von etwa 48 kDa, ein paar schwächere Proteinbanden lagen auf der Höhe von etwa 76, 74, 72 und 57 kDa.

Im weiteren galt es abzuklären, gegen welche der APMV-1 Virusproteine im Western Blot Antikörper detektiert werden. Ein definiert PPMV-1 positives Taubenserum wies im Western Blot 4 Hauptbanden auf (Abb. 13, Nr.1). Im Vergleich zum Marker kam es dabei zu einer Reaktion bei etwa 74 kDa. Es folgten zwei eng beieinander liegende Banden (Im weiteren auch als Doppelbande (DB) bezeichnet), die sich auf der Höhe zwischen 55 und 43 kDa befanden. Die unterste, gut zu erkennende Bande lag auf der Höhe von etwa 40 kDa. Nach Ihrem Molekulargewicht, konnten den Banden die Virusproteinen HN im Bereich der obersten Bande (74kDa), F1/P/NP, komigrierend und nicht weiter zu differenzieren im Bereich der Doppelbande (43-55 kDa) und M, im Bereich der untersten Bande, (40 kDa) zugeordnet werden.

Diese Proteinidentifikation der Virusaufreinigung konnte mit monoklonalen Seren bzw. einem monospezifischen Serum bestätigt werden. Der gegen das HN Protein gerichtete monoklonale Antikörper (mAK), reagierte im Bereich von etwa 74 kDa wo auch das positive Taubenserum eine Bande aufwies (Abb. 13, Nr 4). Der NP spezifische mAK reagierte im Bereich der Doppelbande sowohl bei 55 als auch bei 43 kDa, wogegen der gegen das P-Protein gerichtete monoklonale Antikörper nur im oberen Teil der Doppelbande, bei etwa 55 kDa binden konnten und hier nur eine schwache Reaktion aufwies (Abb. 13, Nr 2 und 3). Ein monospezifisches Serum aus Kaninchen, das gegen das F Protein gerichtet war reagierte zum einen im Bereich der Doppelbande und zusätzlich im Bereich von ca. 170 kDa, wo das positive Taubenserum keine Bande aufwies. Insgesamt befanden sich die Virusproteine an

den erwarteten Positionen und konnten durch die Antikörper als Virusprotein verifiziert werden.



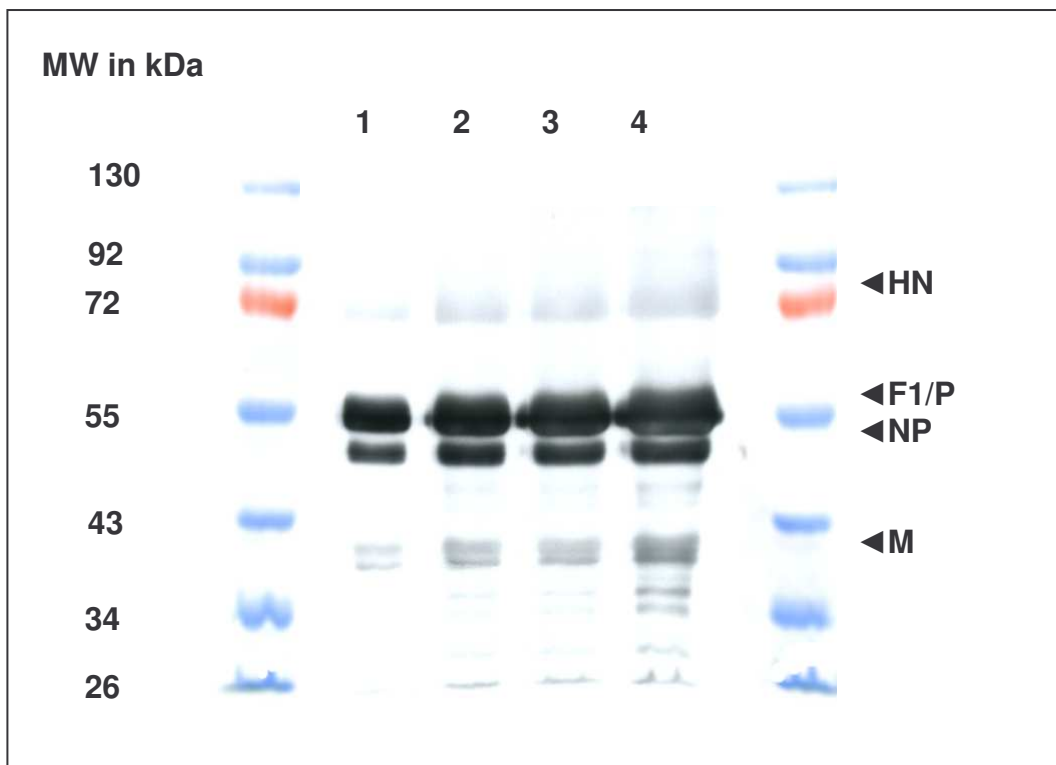
**Abb. 13:**

#### **Darstellung der APMV-1 Proteine im Western Blot**

Dargestellt ist die Reaktivität eines PPMV-1 spezifischen Taubenserums (1), sowie monoklonaler Antikörpern spezifisch für das NP-Protein (2), das P-Protein (3), das HN-Protein (4) und die Reaktion eines F-Protein spezifischen Serums aus einem Kaninchen (5) mit dem Antigen APMV-1 LaSota im Western Blot. Durch die spezifischen Reaktionen der Antikörper konnten die Virusproteine charakterisiert und an Hand des mitgeführten Markers das spezifische Gewicht errechnet werden.

Mit dem Ziel, eine Virusmenge zu ermitteln, bei der die vier virusspezifischen Hauptbanden HN, P/NP/F1 und M im Western Blot eine deutliche Reaktion aufwiesen und Hintergrundreaktionen möglichst gering ausfielen, wurden verschiedene Virusmengen pro Spur untersucht (Abb. 14). Hierfür wurden von der Antigenverdünnung pro Spur 5, 10, 15 bzw. 20µl eingesetzt. Die Volumina enthielten 1,25µg, 2,5µg, 3,75µg bzw. 5µg Antigen. Bei der größten Menge des Antigens (5µg), traten mit dem PPMV-1 positiven Taubenserum in einer Verdünnung von 1:800 die 4

Hauptbanden sowie unspezifische Banden im Bereich von 34 kDa auf. Bei der geringsten verwendeten Menge (1,25µg), kam es zum Verblässen der HN-Bande. Beim Einsatz von 2,5 µg und 3,75 µg waren alle vier virusspezifische Banden gut zu erkennen, unspezifische Banden traten nicht auf. Es gab zwischen den beiden Konzentrationen keinen wesentlichen Unterschied im Reaktionsmuster. Im Folgenden wurde die Virusmenge gewählt, bei welcher die vier Hauptbanden noch gut sichtbar waren und die den geringsten Antigeneinsatz forderte, was auch unspezifische Reaktionen verringert. Demnach wurde für die weiteren Versuche als Virusmenge von 2,5µg pro 0,5cm Lauffront gewählt (Abb. Nr. 14).



**Abb. 14: Titration des APMV-1 Antigens**

Variierende Mengen einer APMV-1 Virusaufreinigung wurden in der SDS-Page aufgetrennt und im Western Blot mit einem PPMV-1 positiven Taubenserum bei einer Verdünnung von 1:800 getestet. An den Seiten ist ein mitgeführter Marker mit der Angabe des Molekulargewichtes der jeweiligen Bande sichtbar. Pro Spur wurden folgende Mengen Virusaufreinigung eingesetzt:

1,25µg (1); 2,5µg (2); 3,75µg (3) und 5 µg (4)

#### **4.3.3.2 Kreuzreaktionen anderer APMV-Stämme mit APMV-1**

In einem weiteren Vorversuch sollten Kreuzreaktionen anderer APMV-Serotypen mit dem APMV-1 Antigen im Western Blot abgeklärt werden.

Hierfür wurden Western Blot-Analysen mit serotypspezifischen Hyperimmunseren durchgeführt. Ein APMV-1 positives Hyperimmunserum wies im Bereich des HN-Proteins eine relativ schwache, im Bereich der Doppelbande und des M Proteins eine deutlich stärkere Reaktion auf (Abb. 15 Nr. 1). Darüberhinaus waren schmale virusunspezifischen Banden unterhalb 43 kDa sichtbar. Auch das APMV-7 Hyperimmunserum reagierte mit alle vier Banden, zeigte jedoch eine sehr schwache Reaktion im Bereich des unteren Teils der Doppelbande. Außer durch das APMV-1 Hyperimmunserum wurde nur durch das APMV-9 Hyperimmunserum die Doppelbande in starker Intensität erkannt. Eine Doppelbande in Kombination mit der M-Bande zeigte sich bei Einsatz der Seren APMV-6 und 9, allerdings fiel die Reaktion mit der unteren Doppelbande hier sehr schwach aus. Andere Seren wiesen eine unterschiedlich starke Reaktivität nur im Bereich der oberen Doppelbande (APMV-2 und -3T) auf. Bei anderen Seren war hierzu zusätzlich die M-Bande sichtbar ( APMV-3(P), 4 und -8).

Am häufigsten und intensivsten waren insgesamt die Kreuzreaktionen im Bereich der oberen Doppelbande (F1, P, NP- Proteine) im Bereich von etwa 55 kDa sowie des M-Proteins (Tab. 9). Alle vier viruspezifischen Banden wurden nur durch das APMV-1 Hyperimmunserum deutlich erkannt.

Tab 9:

Reaktionen der APMV Antiseren 1-9 und den Proteinen von APMV-1 im Western Blot

	APMV-Hyperimmunseren								
	1	2	3 (P)	3 (T)	4	6	7	8	9
HN	x						x		
DB	X	X	X	x	X	X	X	X	X
DB	X				x	x	x		X
M	X		X		x	X	X	x	x

X starke Reaktion x schwache Reaktion

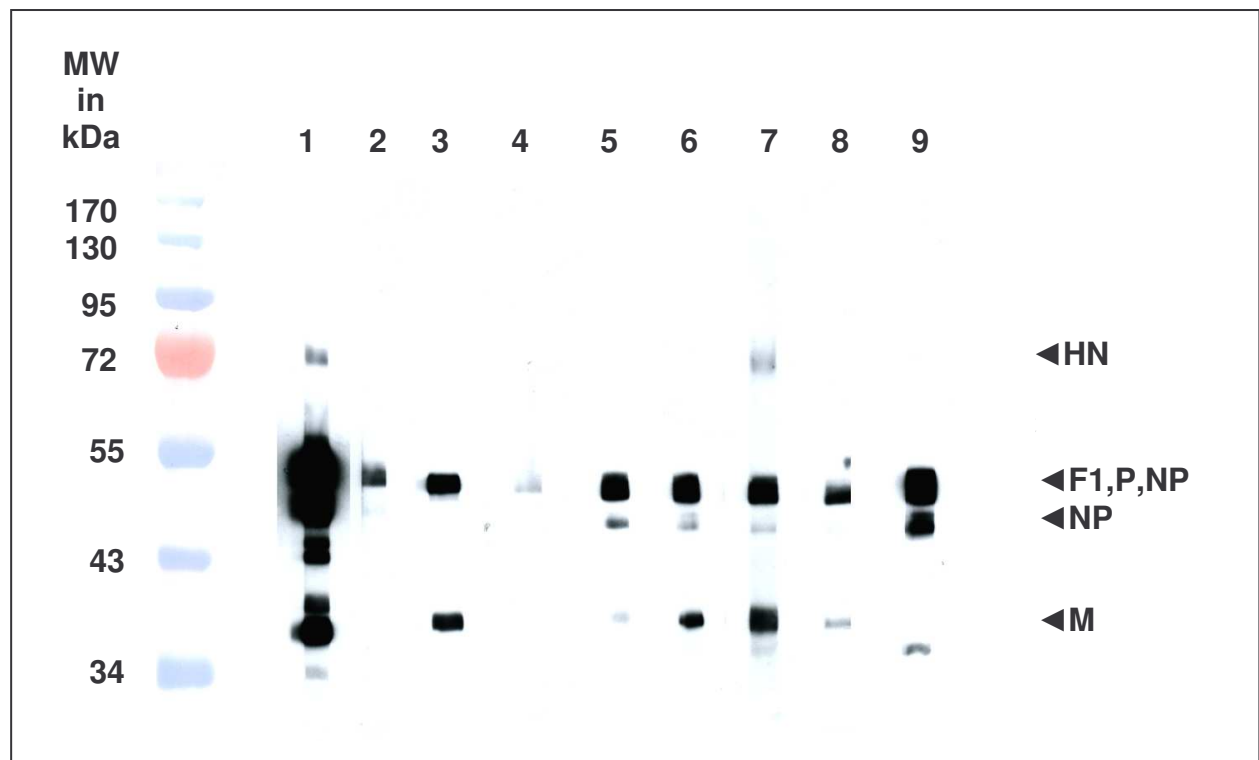


Abb. 15:

**Kreuzreaktionen zwischen APMV-Hyperimmunseren und APMV-1**

Getestet wurde eine Kreuzreaktion von gegen verschiedene APMV-Stämme gerichteten Hyperimmunseren der APMV mit dem Antigen APMV-1 im Western Blot. Hierbei wurde das APMV-1 Hyperimmunserum in einer Verdünnung 1:5000 eingesetzt, alle anderen Seren in einer Verdünnung 1:1000. Über den mitgeführten

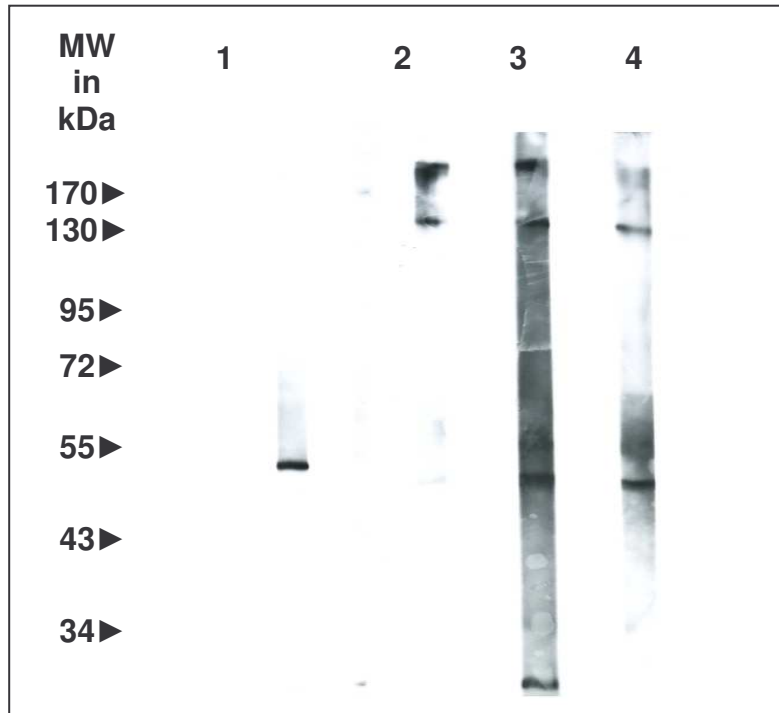
Marker lassen sich die Molekulargewichte der durch die Antikörper erkannten Proteinbanden ermitteln. Verwendet wurden die Hyperimmunseren gegen die Serotypen:

APMV-1 (1), APMV-2 (2), APMV-3 (P) (3), APMV-3 (T) (4), APMV-4 (5), APMV-6 (6)  
APMV-7 (7), APMV-8 (8) und APMV-9 (9)

Da die Anzucht von Virus im embryonierten Hühnerei erfolgt, können in einer Virusaufreinigung folglich auch Proteine der Amnioallantoisflüssigkeit enthalten sein. Zur Abklärung, ob es sich bei den festgestellten Kreuzreaktionen um virusspezifische Reaktionen oder aber um Kreuzreaktionen mit anderen in der Virusaufreinigung vorhandenen Proteinen handelte, wurden folglich die entsprechenden Hyperimmunseren mit infizierter Amnioallantoisflüssigkeit getestet (Abb. 16).

Hierfür wurde nach dem gleichen Protokoll aufgereinigtes und in der SDS-page aufgetrenntes H5N1 eingesetzt. Die Membranstreifen wurden mit den gegen die Serotypen -1,- 2, -3P, -3T, -4, -6, -7, -8 und -9 gerichteten Hyperimmunseren untersucht. Es kam zu Reaktionen im Bereich von ca. 50 kDa durch die Hyperimmunseren 1, 7, und 8. Darüber hinaus kam es bei den Seren -6, -7, und -8 zu einer Reaktivität im Bereich von ca. 170 kDa. Alle anderen Hyperimmunseren zeigten keine Kreuzreaktionen mit den Proteinen der infizierten Amnioallantoisflüssigkeit.





**Abb. 16:**

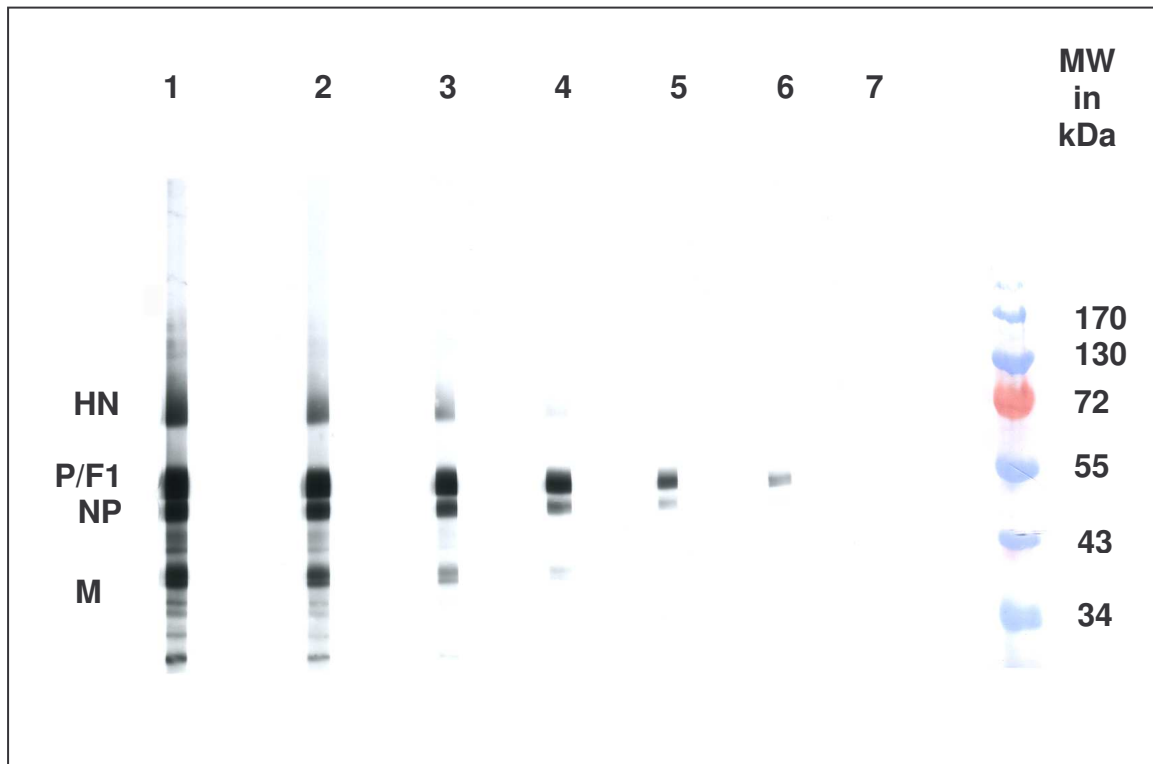
**Kreuzreaktionen von APMV-Hyperimmunseren mit Proteinen einer H5N1 infizierten Amnioallantiosflüssigkeit**

Dargestellt sind Reaktionen der Hyperimmunseren gegen die Serotypen APMV-1 (1), 6 (2) 7 (3) und 8(4), in der eingesetzten Verdünnung von 1:1000 mit Proteinen der Amnioallantiosflüssigkeit einer H5N1 Aufreinigung im Western Blot. Die H5N1 Aufreinigung war nach dem selben Protokoll hergestellt wie die für die Tests verwendete APMV-1 LaSota Aufreinigung und wurde in einer Konzentration von 0,57 µg pro mm eingesetzt.

**4.3.3.3 Titration eines definiert positiven Taubenserums**

Es sollte untersucht werden, welche Virusproteine die durch die Serumantikörper im Western Blot erkannt werden können und mit welchen Virusproteinen diese schwerpunktmäßig reagieren. Des Weiteren sollte eine geeignete Serumverdünnung für die nachfolgenden Tests ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Titration eines PPMV-1 positiven Taubenserums vorgenommen (Abb. 17). Bei Einsatz der

ersten zwei Serumverdünnungsstufen (1:200 und 1:400) des PPMV-1 positiven Taubenserums zeigten sich die Doppelbande sowie je eine deutliche breite Bande im Bereich des HN- und des M-Proteins. Diese Banden erschienen bei der zweiten Verdünnungsstufe geringfügig blasser als bei der ersten, jedoch war auch die Hintergrundreaktionen nicht so ausgeprägt. Zusätzlich waren zwei schmalere unspezifische Banden im Bereich zwischen 55 und 43 kDa sichtbar und vier schmale unspezifische Banden unterhalb 43 kDa. Ab einer Verdünnung des eingesetzten Positivserums von 1: 800 traten die schmalen unspezifischen Banden nicht mehr auf, während die Banden des HN- und des M-Proteins bereits blasser wurden. Anschließend verblasste zunächst die HN Bande bei einer Verdünnung von 1:1600, danach die M Bande bei einer Verdünnung von 1:3200. Bei weiterer Verdünnung (1:6400) verblasste schließlich der untere Teil der Doppelbande, so dass zuletzt nur noch der obere Teil der Doppelbande sichtbar blieb. Dieser war später bei einer Serumverdünnung von 1:12800 nicht mehr zu erkennen. Für die weiteren Versuche wurde die Serumverdünnung 1:800 gewählt, bei der die vier virusspezifischen Hauptbanden noch deutlich zu erkennen waren und praktisch keine Hintergrundreaktionen mehr auftrat. Ein definiert APMV negatives Taubenserum wurde mit der ausgewählten Verdünnungsstufe (1:800) im Western Blot untersucht. Es zeigte sich eine schmale Bande mit geringer Intensität im oberen Teil der Doppelbande (Abb. 19, Nr. 2) Auch der Schwerpunkt der Kreuzreaktivitäten der anderen APMV-Serotypen lag in diesem Bereich (Abb. 15). Demnach wurden in den weiteren Untersuchungen diese Bande, wenn sie alleine auftrat, als möglicherweise virusunspezifisch gewertet und das entsprechende Serum als negativ gewertet. Da bei dem PPMV-1 positiven Taubenserum die Reaktion im Bereich der Doppelbande am stärksten ausfiel, so dass sie auch bei der Verdünnung des Positivserums von 1:3200 noch erkennbar war, wurden Seren die im Bereich der vollständigen Doppelbande reagierten, als positiv gewertet.



**Abb. 17**

#### **Verdünnungsstufen eines PPMV-1 positiven Taubenserums**

Es wurden die Reaktionen der Antikörper eines PPMV-1 positiven Taubenserums mit den Proteinen von APMV-1 im Western Blot getestet. Dabei wurde das positive Taubenserum in abnehmenden Konzentrationsstufen eingesetzt. Mit zunehmender Verdünnung des Serums ist eine Abnahme der Bandenzahl zu erkennen.

Verdünnungsstufen:

1) 1:200 2) 1: 400 3) 1:800 4) 1: 1600 5) 1:3200 6) 1: 6400 7) 1: 12800

#### **4.3.3.4 Untersuchung der Ringeltaubenserum im Western Blot**

Sämtliche 241 Ringeltaubenserum wurden einer Untersuchung auf APMV-1 spezifische Antikörper mittels Western Blot zugeführt. Bei der Bewertung der Reaktionen der Ringeltaubenserum im Western Blot wurde darauf geachtet, ob und an welcher Stelle virusspezifische Banden auftraten. Es ließen sich unterschiedlichste Bandenmuster feststellen (Abb. 18). Bei einem Teil der Seren war

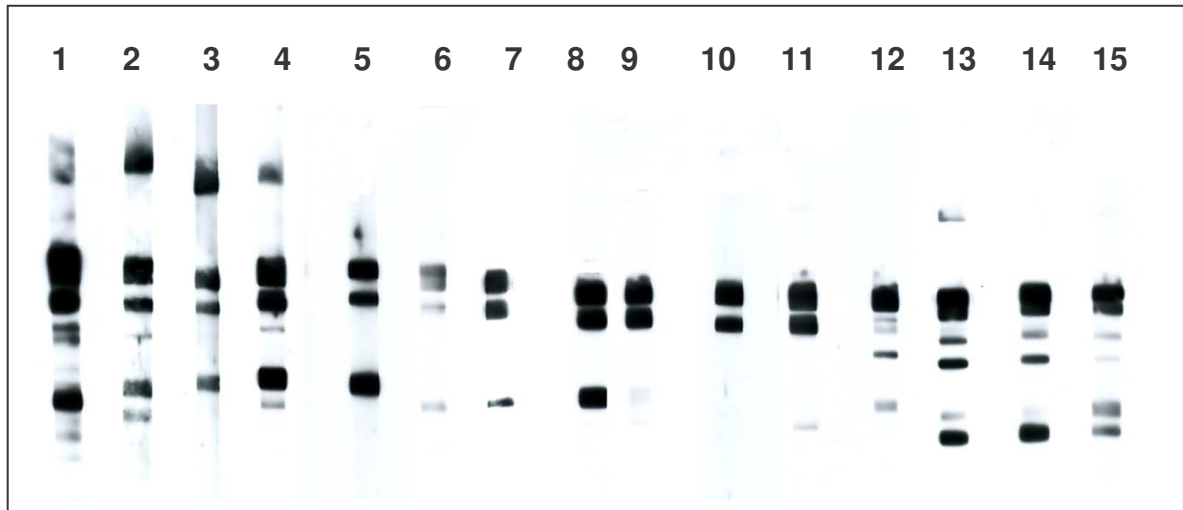
eine Reaktion mit allen vier virusspezifischen Banden gleichzeitig anzutreffen (HN, DB1, DB2, M). Beim Auftreten von drei virusspezifischen Banden kam es zu Kombinationen der Doppelbande (DB 1+2) mit der HN- oder M-Bande. Bei zwei virusspezifischen Banden handelte es sich zumeist um die Doppelbande, aber auch der obere Teil der Doppelbande in Kombination der HN- oder M-Bande kam vor. Die Intensität der Reaktion mit den Virusbanden war unterschiedlich ausgeprägt, meist trat die Doppelbande im Vergleich zu anderen Virusbanden deutlicher hervor. Auch unterschieden sich die Banden in Ihrer Breite. Meist handelte es sich um Banden, deren Breite mit denen des positiven Kontrollserums vergleichbar waren, es kamen jedoch auch weitaus schmalere Banden vor. (Abb. 18, Nr. 12-15).

erfolgte Anhand der Doppelbande eine Einteilung der Seren in positiv, unabhängig von ihrer Intensität und Breite sowie anderen auftretenden Banden.

Bei einigen Seren war nur eine einzige virusspezifische Bande festzustellen. Hierbei handelte es sich zumeist um den oberen Teil der Doppelbande, aber auch die M Bande trat isoliert auf. Einige Seren zeigten im Western Blot keinerlei Reaktion mit den Virusproteinen. Alle Seren, die nur den oberen Teil der Doppelbande (DB 1) oder gar keine Virusbande aufwiesen galten als negativ (Abb. 19).

Seren die mindestens eine Virusspezifische Bande aufwiesen, die nicht dem oberen Teil der Doppelbande entsprach, aber die Doppelbande nicht oder nicht vollständig erkannten, wurden als fraglich eingestuft.

Banden die nicht virusspezifisch waren, hatten keinen Einfluss auf die Bewertung der Seren. Einige Seren verursachten eine starke Hintergrundreaktionen die den Membranstreifen vollständig schwärzten, so dass virusspezifische Reaktionen nicht mehr zu ermitteln waren. Diese Seren waren nicht auswertbar.



**Abb. 18:**

**Reaktionsmuster von als positiv bewerteten Taubenseren**

Insgesamt 241 Ringeltaubenseren wurde im Western Blot bei einer Verdünnung von 1:800 mit dem APMV-1 Antigen getestet. Abgebildet sind Reaktionsmuster von Ringeltaubenseren, die im Western Blot mit APMV-1 im Bereich der virusspezifischen Doppelbande reagierten und daher als APMV-1 positiv gewertet wurden. Dargestellt sind verschiedene Bandenmuster positiv bewerteter Seren:

- definiertes positives Taubenserum (1)
- Seren mit 4 virusspezifischen Banden (2-4)
- Seren mit 3 virusspezifischen Banden (6-8)
- Seren mit 2 Banden (virusspezifischer Doppelbande) (9-11)
- Seren mit schmalen Banden im Bereich der virusspezifischen Proteine (12-15)



**Abb. 19:**

**Reaktion von APMV-1 positiven und negativen Taubenseren mit APMV-1 im Western Blot**

Abgebildet ist die Reaktion eines APMV-1 positiven Taubenserums mit APMV-1 Proteinen im Western Blot (1). Im Vergleich hierzu sind unspezifische Reaktionen von einem definiert negativem Taubens Serum (2), sowie im Western Blot negativ bewerteten Ringeltaubenseren dargestellt, die nur den oberen Teil der Doppelbande erkannten.

Am häufigsten trat bei den als positiv bewerteten Seren nur eine Doppelbande auf, gefolgt von Seren, bei denen alle vier zu erwartenden virusspezifischen Banden auftraten (Tab. 10). Etwas seltener waren Kombinationen der Doppel- mit der M-Bande zu beobachten. Die Doppelbande in Verbindung mit der HN-Bande war am seltensten unter den als positiv bewerteten Seren vertreten.

**Tab. 10:**

**Reaktionsmuster von im Western Blot APMV-1 positiv bewerteter Ringeltaubenseren**

Virusbanden	2	3	3	4
HN		X		X
DB1	X	X	X	X
DB2	X	X	X	X
M			X	X
Anzahl der Seren	36	7	22	28
Anteil in Prozent <sup>1</sup>	38%	8%	24%	30%
<b>Gesamt: 93 Seren</b>				

<sup>1</sup> Prozentualer Anteil bezogen auf alle Seren dieser Gruppe

X = variierende Reaktivität der mit dieser Bande

Bei den als negativ zu bewertenden Seren kamen Seren ohne eine Bande etwa ebenso häufig vor wie Seren die eine Bande zeigten, die sich auf derselben Höhe wie die des definierten negativen Taubenserums befand (Tab. 11).

**Tab. 11:**

**Reaktionsmuster von im Western Blot APMV-1 negativ bewerteter Ringeltaubenseren**

Virusbanden	1	0
HN		
DB1	X	
DB2		
M		
Anzahl der Seren	53	49
Anteil in Prozent <sup>1</sup>	52 %	48 %
<b>Gesamt 102 Seren</b>		

<sup>1</sup> Prozentualer Anteil bezogen auf alle Seren dieser Gruppe

X = variierende Reaktivität der Seren mit dieser Bande

Seren, die im Bandenmuster zwar virusspezifische Banden, nicht jedoch die Doppelbande aufwiesen, traten nur vereinzelt auf und wurden als fraglich beurteilt. Nicht auswertbar auf Grund zu starker Hintergrundreaktionen, waren etwa 11% der Seren (Tab. 12).

**Tab. 12:**

**Reaktionsmuster von im Western Blot APMV-1 nicht eindeutig zuzuordnende Ringeltaubenseren**

Virusbanden	Fragliche Seren				n.a. <sup>2</sup>
HN		X		X	
DB1		X	X	X	
DB2					
M	X		X	X	
Anzahl der Seren	15				
Anteil in Prozent <sup>1</sup>	33%				67%
<b>Gesamt</b>	<b>46</b>				

<sup>1</sup> Prozentualer Anteil bezogen auf alle Seren dieser Gruppe

<sup>2</sup> nicht auswertbare Seren

X = variierende Reaktivität der Seren mit dieser Bande

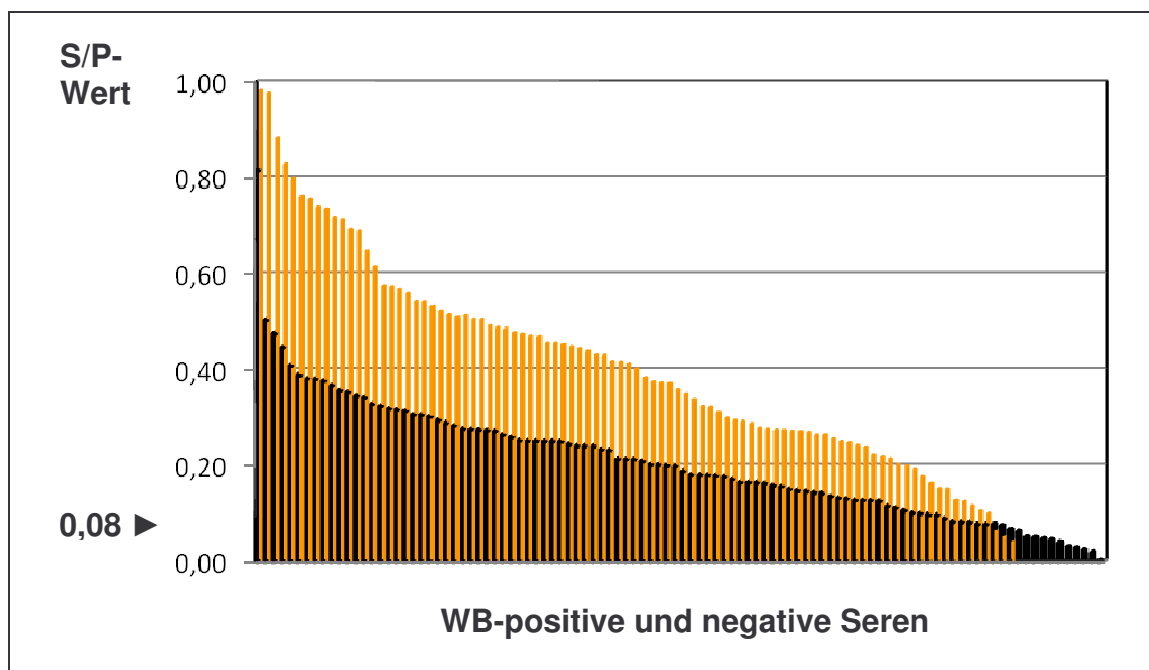
#### 4.3.4 Vergleich der Ergebnisse des Western Blot und des ELISA

Nach der Bewertung des ELISA über die anhand der SPF-Seren definierten Ausschlussgrenze von 0,08, ließen sich 222 positive Seren ermitteln. Demgegenüber konnten durch den WB nur 93 positive Seren festgestellt werden. Damit bestand zwischen den Ergebnissen beider Testverfahren eine große Diskrepanz.

Bei den Ringeltaubenseren mit unbekanntem APMV-Status war eine genaue Zuordnung in positiv oder negativ nur an Hand des visuell überprüfbareren Ergebnisses im Westernblot möglich. Einige Seren waren hier jedoch nicht auswertbar oder nicht genau zuzuordnen. Um den ELISA bewerten zu können, wurden die Seren ausgewählt, zu welchen der Western Blot ein eindeutiges Ergebnis liefern



konnte. Diese Gruppe umfasste 195 Seren mit 93 positiven und 102 negativen Seren. Nun wurde den als Western Blot positiv bzw negativ definierten Seren ihr im ELISA erreichter S/P-Wert zugeordnet (Abb. 20). Es stellte sich heraus, dass das Niveau der S/P-Werte der WB-positiven Seren insgesamt höher lag als das der WB-negativen Seren. Es konnten jedoch WB-positive Seren sehr niedrige Werte im ELISA aufweisen und umgekehrt wurden WB-negative Seren mit sehr hohen S/P-Werten verzeichnet werden. Insgesamt reichte die Verteilung der S/P Werte bei den WB-positiven Seren von 0,05 bis 0,98 und bei den WB-negativen Seren von 0,00 bis 0,82. Nicht nur die meisten S/P Werte der WB positiven lagen weit über der ermittelten Ausschlussgrenze von 0,08, auch WB-negative Seren wiesen zu Großteil weit über der Ausschlussgrenze liegende S/P-Werte auf.



**Abb. 20:**

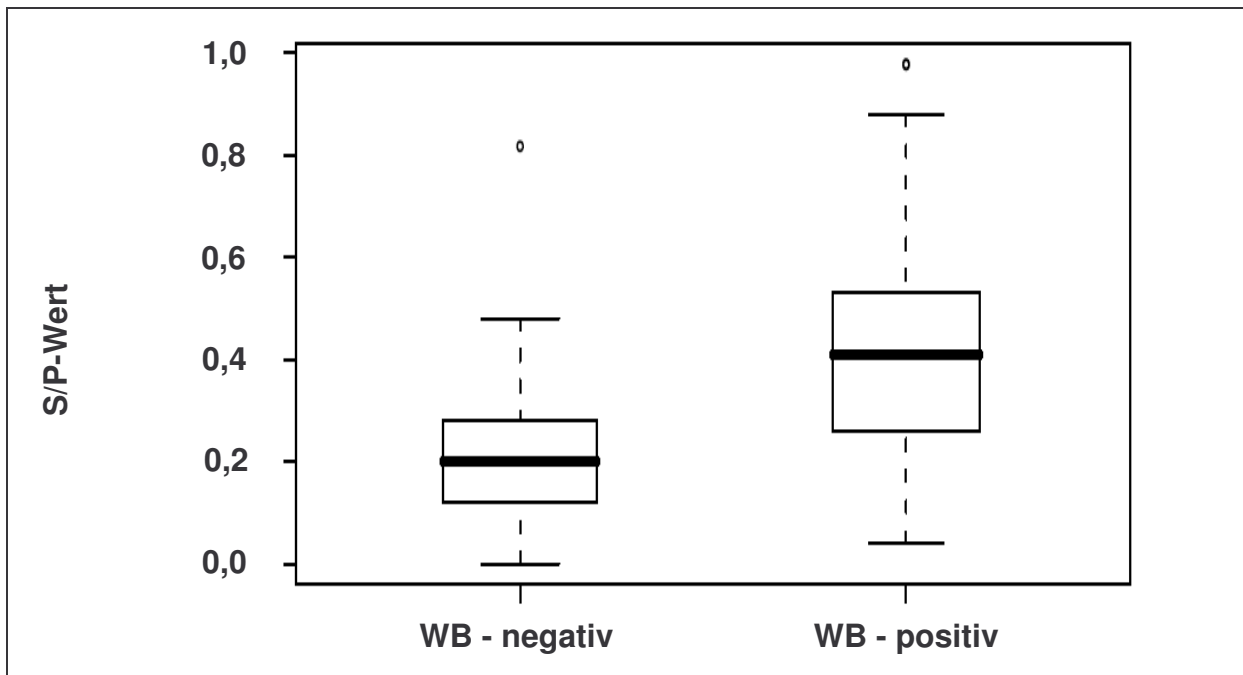
### **Ergebnisse des ELISA und des Western Blot im Vergleich**

Die Abbildung zeigt die im Western Blot als positiv bzw. negativ definierten Seren und ihre dazugehörigen S/P-Werte. Für jedes getestete Serum gilt ein Strich, dessen Farbe dem Ergebnis des Western Blots entspricht und dessen Länge abhängig ist vom S/P-Werte des ELISA.

(▲) Western Blot negative Seren      (▲) Western Blot positive Seren

Der Median der S/P-Werte der WB-negativen Seren lag bei diesem Vergleich deutlich niedriger als bei den WB-positiven Seren (Abb. 21). Bei den WB-positiven kam es zu einer breiteren Streuung der S/P Werte als bei den WB-negativen.

Zwischen den S/P-Werten der beiden Gruppen konnte mittels Wilcoxon Rangsummentest ein signifikanter Unterschied (P-Wert 0,03) festgestellt werden.



**Abb. 21:**

#### **Verteilung der S/P im ELISA von über den Western Blot definierten Seren**

Die S/P-Werte des ELISA wurden anhand der Western Blot Ergebnisse seropositiven oder seronegativen Tieren zugeordnet. Die S/P-Werte der Western Blot-negativen Seren unterschieden sich signifikant von denen der Western Blot-positiven. In beiden Gruppen kam es zu einer breiten Streuung der S/P-Werte. Innerhalb der Box befinden sich 50% der S/P Werte, der Balken innerhalb der Box beschreibt den Median der Werte. Einzelne Werte wichen stark vom Medianwert ab.

(Quelle: WILKING, FLI-Wusterhausen)

Die Ergebnisse des Vergleichs der beiden Testverfahren führten zu der Annahme, dass die Ringeltaubenseran im ELISA möglicher Weise eine hohe Hintergrundreaktionen hervorriefen und daher die über die SPF-Tauben erstellte Ausschlussgrenze für die Bewertung des Tests nicht geeignet war. Anhand der über den WB vorgenommenen Gruppierung der S/P Werte in positiv und negativ, wurde

mittels ROC-Analyse die Ausschlussgrenze für den ELISA ermittelt, die mit der besten Sensitivität und Spezifität einherging. (Abb. 22). Dieser Wert lag bei 0,27. Mit dieser Ausschlussgrenze lag die Sensitivität des ELISA bei 0,74 und die Spezifität bei 0,70. Mit dieser Ausschlussgrenze wurde eine weitaus größere Testsicherheit des ELISA erzielt als mit der über die SPF-Seren ermittelte Ausschlussgrenze (Tab. 13). Die „area under the curve“ (AUC) betrug bei dieser Ausschlussgrenze 0,72, was eine mittelmäßige Testqualität bedeutet.

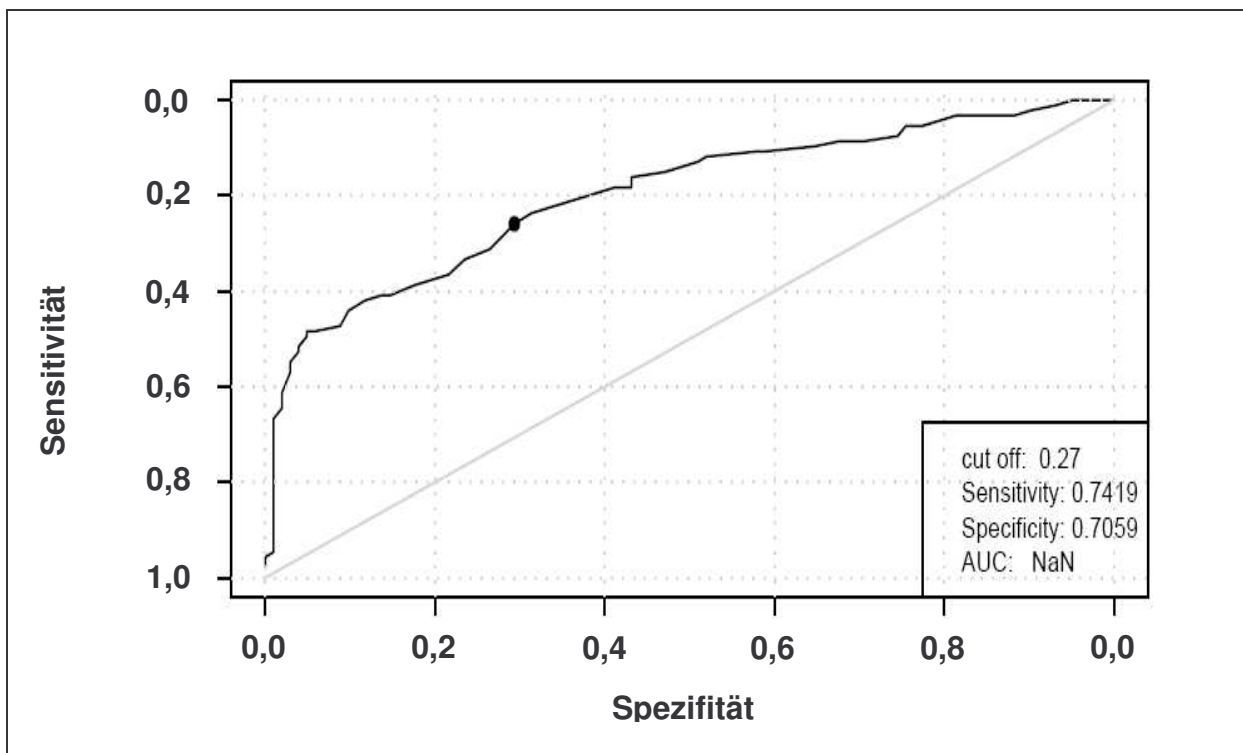


Abb. 22:

### Ermittlung der besten Ausschlussgrenze (Cut off) für die Bewertung des ELISA mittels ROC-Analyse

Für die Berechnung der Ausschlussgrenze wurden für alle Möglichkeiten in 0,01 Abständen zwischen 0 und 1 die zugehörige Sensitivität und Spezifität errechnet. In Abhängigkeit dieser Werte kommt es zu einem Eintrag in den Graphen. Die Ausschlussgrenze die sich dabei dem linken oberen Eck am meisten nähert, gibt dabei das beste Ergebnis im untersuchten Testverfahren und liegt hier bei 0,27. Die AUC liegt bei dieser Ausschlussgrenze bei 0,72.

(Quelle: WILKING, FLI-Wusterhausen)

Tab. 13:

**Testgenauigkeit des ELISA bei unterschiedlichen Ausschlussgrenzen**

Ausschlussgrenze		WB positiv	WB negativ	Sens	Spez
0,08	ELISA pos	90	3	97%	13%
	ELISA neg	89	13		
0,27	ELISA pos	69	30	74%	70%
	ELISA neg	24	72		

Es sollte anschließend überprüft werden, ob es sich bei den im Western Blot fraglichen Seren um zufällige Ereignisse handelte, oder um stark positive oder stark negative Seren. Dafür wurden die S/P-Werte dieser Gruppe mit den S/P-Werten der WB-negativen und positiven Seren verglichen (Abb. 23). Hier zeigte sich, dass die ELISA-Werte der fraglichen Seren im Bereich zwischen positiv und negativ anzusiedeln waren. Die Spanne reichte hier von 0,01-0,5.

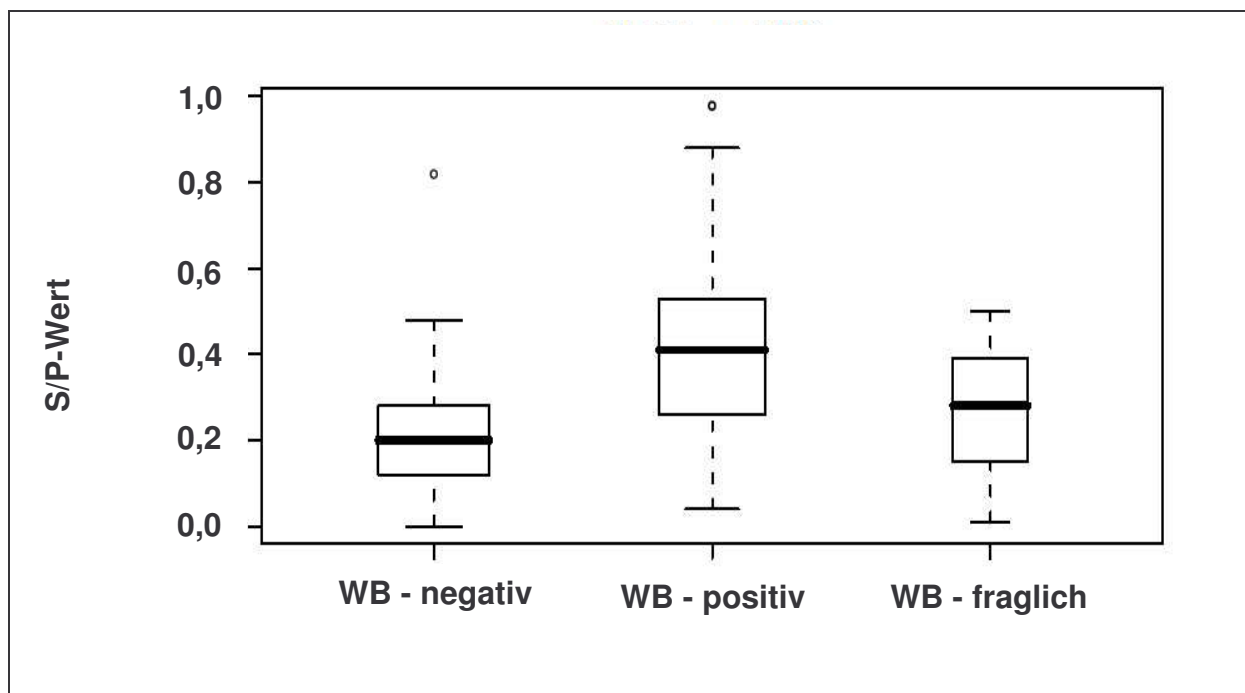


Abb. 23:

**Verteilung der S/P-Werte der WB negativen, positiven und fraglichen Seren.**

Dargestellt ist die Verteilung der S/P Werte der Seren nach ihrer Einteilung in die durch den WB ermittelten Gruppen. Die Median der fraglichen Seren lag dabei

zwischen den Medianen der positiven und negativen Seren. (Quelle: Hendrick Wilking, FLI-Wusterhausen)

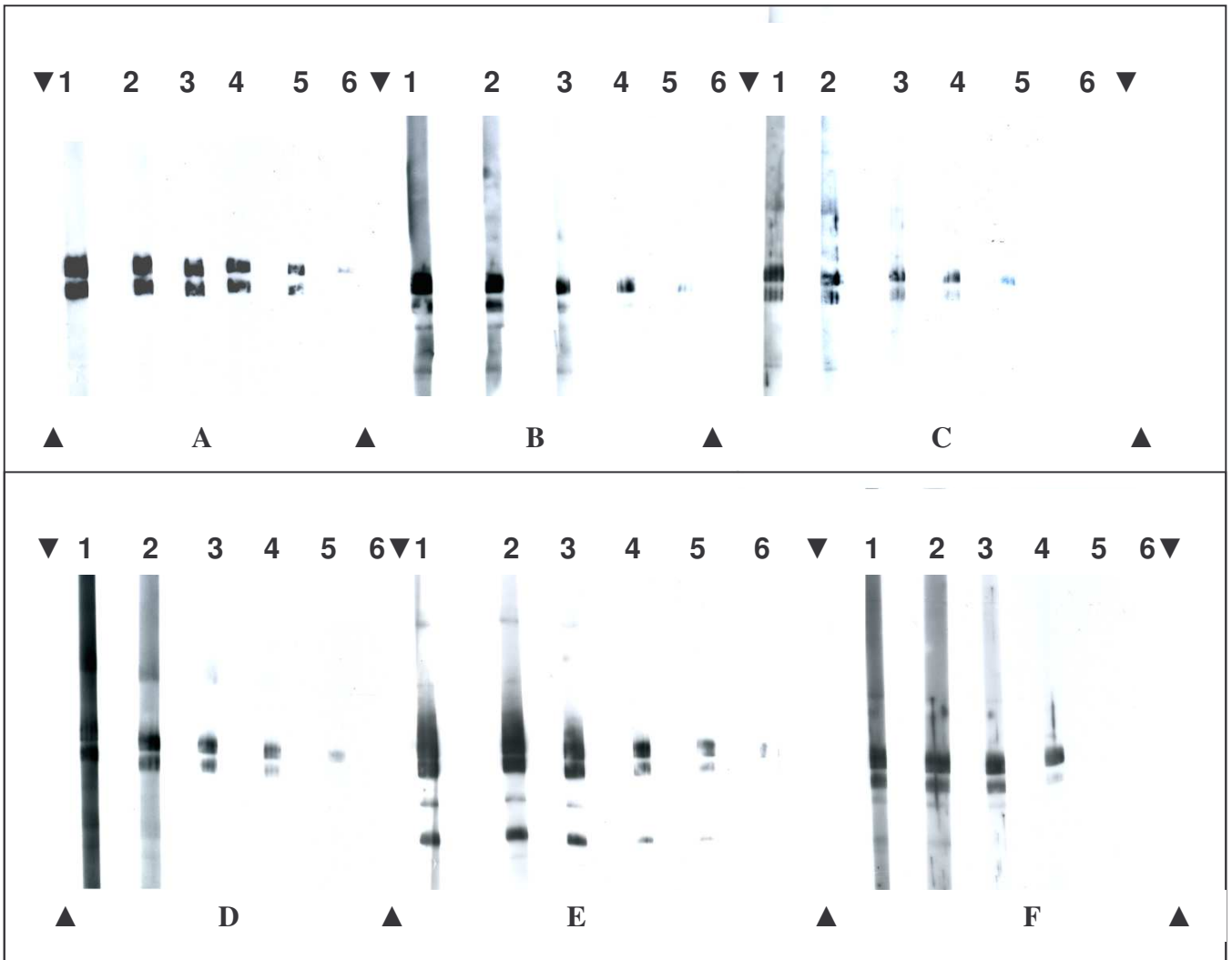
#### **4.3.4.1 Ermittlung der analytischen Sensitivität des ELISA und des Western Blot**

Um zu ermitteln, wie die tatsächliche analytische Sensitivität des ELISA im Vergleich zum Western Blot bei der Ausschlussgrenze von 0,27 zu beurteilen war, wurden sechs im Western Blot als positiv bewertete Seren sowohl im Western Blot als auch im ELISA titriert.

Im Western Blot wurde bei steigender Verdünnung eine Abnahme der Bandenintensität und Bandenanzahl festgestellt (Abb. 24). Je nach Testserum waren die Banden anfangs in unterschiedlicher Anzahl und Intensität vorhanden, und so verblassten sie auch bei sinkender Serumkonzentration in unterschiedlicher Reihenfolge. Zuletzt blieb hier jedoch auch in jedem Fall die Doppelbande bestehen. Die ersten zwei Verdünnungsstufen wiesen teilweise noch starke Hintergrundreaktionen auf. Die Doppelbande war bis zu einer Verdünnung von 1:800 bei allen sechs Seren noch sichtbar. Ab der fünften Verdünnungsstufe (1:3200), war sie nur noch bei zwei Seren sichtbar, ab der sechsten (1: 6400) war die Doppelbande bei keinem Serum mehr sichtbar. Der Endtiter der Seren lag damit zwischen 800 und 3200.

Bei der Verdünnung dieser sechs positiven Seren im ELISA kam es zu einem gleichmäßigen Absinken der S/P-Werte im Laufe der Verdünnung (Abb. 25). Die Anfangs-S/P-Werte lagen zwischen 0,89 und 1,34, welche bis zur 11. Verdünnungsstufe sich immer weiter dem Wert 0 näherten. Beim ELISA lag der Endtiter der Seren für eine positive Bewertung zwischen 1:400 und 1:12800.

Im Vergleich zum Western Blot zeigte der ELISA unter Bewertung der Ausschlussgrenze von 0,27 eine geringere Sensitivität (Tab. 14).



**Abb. 24:**

**Verdünnungsstufen von positiven Ringeltaubenserens**

Dargestellt sind sechs positive Ringeltaubenserens, die jeweils in den Verdünnungsstufen 1: 200., 1: 400, 1: 800 1:1600 1:3200 und 1: 6400 im Western Blot getestet wurden. Dabei kam es zu einem Verblässen der Doppelbande in unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Es wurde und die maximale Verdünnungsstufe für eine positive Bewertung ermittelt.

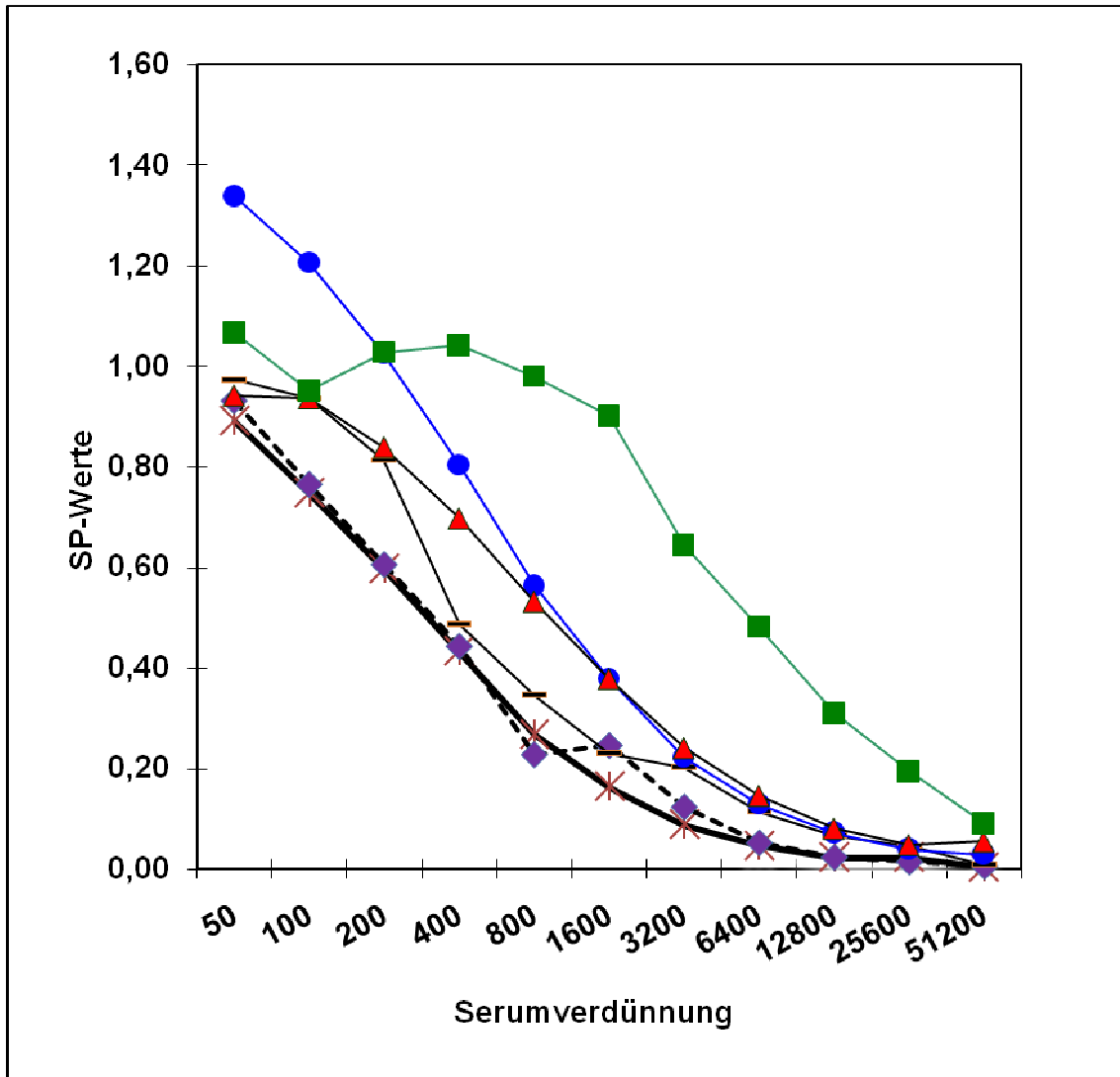


Abb. 25:

**SP-Werte im Verlauf der Verdünnung von positiven Ringeltaubenseren**

Getestet wurden im ELISA die zuvor im Western Blot titrierten positiven Taubenseren in den Verdünnungsstufen 1:50-1:512000. Dargestellt ist der Verlauf der S/P-Werte der entsprechenden Seren in Abhängigkeit zu Serumkonzentration.

Zuordnung der Seren zu den Seren im Western Blot:

- A      \* B      ◆ C      ● D      — E      ▲ F

Tab. 14:

Vergleichende Titrations APMV positiver Ringeltaubenseren im Western Blot und ELISA

Serum- verdünnung	Serum mit letzter Titerstufe für eine positive Bewertung					
	A	B	C	D	E	F
1:400		■	■			
1:800		●			■	
1:1600			●	● ■		● ■
1:3200	●				●	
1:6400						
1:12800	■					
1:25600						
1:51200						

Western Blot-positiv ( ● )

ELISA-Positiv bei Ausschlussgrenze 0,27 ( ■ )

#### 4.3.5 HAH mit den Antigenen APMV-2-9

Da der Western Blot und der ELISA mehr positive Ergebnisse ergaben als die HAH Untersuchung mit dem APMV-1 Antigen, sollte für die WB-positiven Ringeltaubenseren abgeklärt werden, ob evtl. Serumantikörper mit anderen APMV-Serotypen als APMV-1 im HAH reagierten. Daher wurden diese Seren gegen die Antigene APMV -2, -3(P), -3T, -6, -7, -8 und -9 getestet.

Durch den Einsatz von spezifischer Hyperimmunsereen gegen die Serotypen APMV-1, -2, -3(P), -3(T), -5, -6, -7, -8 und -9, die jeweils mit jedem Antigen getestet wurden, ließen sich Kreuzreaktionen zwischen den Seren und den Antigenen



darstellen (Tab. 15). Kreuzreaktionen von APMV-1 Seren konnten vor allem mit dem Antigen APMV-3 beobachtet werden und mit dem APMV-1 Antigen konnten vor allem Kreuzreaktionen durch die Hyperimmunseren ausgelöst werden, die gegen die Antigene -3, -6 und -7 gerichtet waren. Kreuzreaktionen mit dem Antigen PPMV-1 waren öfters zu beobachten und fielen stärker aus als mit dem Antigen APMV-1. Die meisten Kreuzreaktionen wurden durch die Hyperimmunseren 1 und 7 ausgelöst. Antigene bei denen die meisten Kreuzreaktionen auftraten waren PPMV-1 und APMV-3(P).

**Tab. 15:**  
**Kreuzreaktionen zwischen Hyperimmunseren und Antigenen verschiedener APMV-Serotypen**

		APMV - Seren									
		1	1p	2	3T	3P	4	6	7	8	9
APMV - Stämme	1	9	8	3	<1	1	4	5	7	2	3
	1p	7	11	3	5	3	5	6	6	4	5
	2	1	2	10	<1	<1	4	5	<1	5	2
	3T	7	7	<1	8	8	<1	<1	<1	3	5
	3P	6	8	2	7	11	5	5	7	4	5
	6	3	<1	5	1	2	5	9	<1	6	2
	7	3	4	2	<1	<1	4	4	10	4	3
	8	3	6	6	<1	<1	6	7	7	12	4
	9	4	6	1	<1	5	3	3	<1	<1	12

- ( ■ ) Reaktion mit dem homologen Antigen
- ( ■ ) Titerunterschied zur Reaktion mit dem homologen Antigen < 4

Beim Einsatz der WB-positiven Ringeltaubenseren reagierte mit dem Antigen APMV-2 ein Serum mit einer Hemmung der Agglutination bis zur dritten Titerstufe

(Tab. 16). Mit dem Antigen APMV-8 riefen 2 Seren eine Hemmung bis zur ersten, zwei bis zur zweiten und 2 Seren eine Hemmung bis zur dritten Titerstufe hervor. Dabei handelte es sich bei dem einen Serum welches die Hämagglutination bis zur dritten Titerstufe hemmte um dasselbe Serum welches auf APMV-1 zu der Hemmung von 5 bzw. 6 Titerstufen führte. Andere hier positiv reagierende Seren reagierten mit APMV-1 negativ.

**Tab. 16:**

**Reaktionen WB positiver Taubenserren im HAH mit anderen APMV Antigenen als APMV-1**

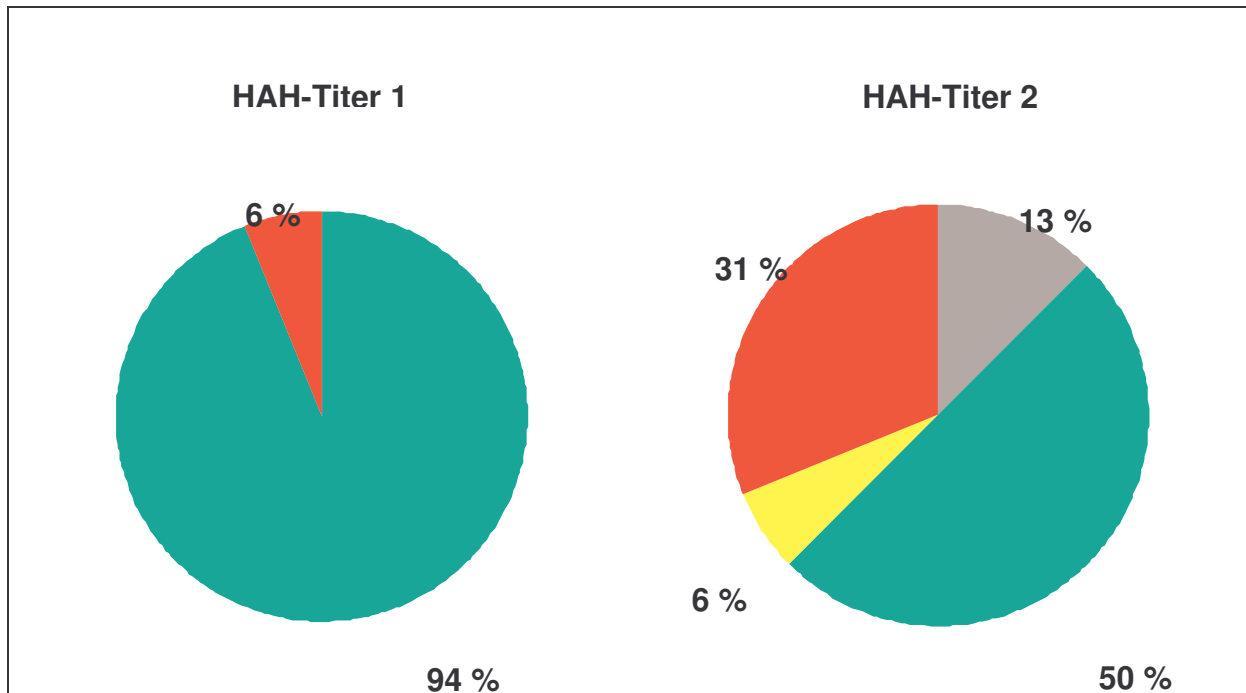
APMV	Titerkennzahl					Positiv <sup>1</sup>
	< 1	1	2	3	4	
2	92			1		0
3	93					0
3	93					0
6	93					0
7	93					0
8	88	2	2	2		0
9	93					0

<sup>1</sup> Seropositiv nach Richtlinie 92/66/EWG: >3

#### 4.3.6 Vergleich aller serologischen Ergebnisse

Von den Seren bei denen im HAH mit APMV-1 eine Hemmung bis zur 3. Verdünnungsstufe auftrat, stellten sich im WB nur 13 von 35 Seren als WB-Positivseren heraus. Dabei war als Trend eine Zunahme des Anteils WB-positiver Seren mit steigender Titerstufe im HAH zu erkennen. (Abb. 26). Bei der 1. Titerstufe betrug der Anteil WB-positiver Seren an allen hier reagierenden Seren nur 6 %. Bei der Titerstufe 3 waren 31% der hier reagierenden Seren auch über den WB als positiv definiert. Bei der Titerstufe 3 reagierten nur zwei Seren, von denen eines WB positiv war. Über den ELISA waren von den im HAH schwach

reagierenden Seren 15 bei einer Ausschlussgrenze von 0,27 als positiv zu beurteilen. Das Serum welches im HAH mit LaSota bis zur 6. und mit PPMV-1 bis zur 5. Verdünnungsstufe positiv ausfiel, wies im Western Blot alle vier virusspezifischen Banden auf und war in der Bandenbreite und Intensität mit dem definierten Positivserum vergleichbar. Im ELISA zeigte es einen S/P-Wert von 0,83.



**Abb. 26:**

**Vergleich der Titerstufen des HAH mit den Ergebnissen des Western Blot**

Dargestellt ist die Verteilung der Western Blotergebnisse der Seren, die im HAH einen Titer von 1 oder 2 aufwiesen. Bei beiden Titerstufen reagierten 16 Seren mit dem Antigen APMV-1 LaSota. Bei einem Titer von 3 war ein von zwei Seren durch den Western Blot positiv bewertet. Ein Serum das einen Titer von 6 erhielt, war ebenfalls im Western Blot positiv und wies hier 4 virusspezifische Banden auf.

- WB positive Seren
- WB negative Seren
- im WB nicht auswertbare Seren
- WB fragliche Seren

#### 4.4 PRÄVALENZSCHÄTZUNG VON APMV BEI RINGELTAUBEN

Zur abschließenden Beurteilung aller Serumproben bezogen auf die Jahre 2007 und 2008, wurden die Testergebnisse der seropositiven Proben von WB und ELISA verglichen. Zunächst wurden die Ergebnisse des WB analysiert. Da durch den WB einige Seren nicht bewertet werden konnten, wurden eine minimale und ein maximale Anzahl für die positiv ausfallenden Seren errechnet. (Tab. 17). Dabei wurden die fraglichen Seren dem positiven bzw. dem negativen Bereich zugeordnet. Innerhalb des entstandenen Intervalles war die wahre Prävalenz zu erwarten.

**Tab. 17:**

##### **Minimale und maximale Jahresverteilung der positiven Ergebnisse im WB**

<b>Jahr</b>	<b>n</b>	<b>mind. pos.</b>	<b>max. pos.</b>
<b>2007</b>	134	22%	62%
<b>2008</b>	107	17%	52%

Bei einer Ausschlussgrenze von 0,27 wurden alle Seren im ELISA entweder positiv oder negativ bewertet. Aus der sich daraus ergebenden Prävalenz ließ sich unter Berücksichtigung der Werte der bekannten Sensitivität und Spezifität des Tests bei dieser Ausschlussgrenze die wahre Prävalenz errechnen (Tab. 18). Das Konfidenzintervall für dieses Testergebnis lag bei 0,95.

**Tab. 18:**

##### **Jahresverteilung der positiven Ergebnisse im ELISA und wahre Prävalenz**

<b>Jahr</b>	<b>n</b>	<b>ELISA - positiv</b>	<b>Wahre Prävalenz</b>
<b>2007</b>	134	52%	<b>51%</b>
<b>2008</b>	107	47%	<b>40%</b>

Damit lagen die errechneten Prävalenzen des innerhalb des ELISA innerhalb des durch den Western Blot vorgegebenen Intervalles.

## **5. DISKUSSION**

### **5.1 GRUND UND ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN**

Trotz weltweiter umfangreicher Bekämpfungsmaßnahmen gegen das Newcastle Disease Virus (NDV, APMV-1), kommt es immer wieder zu Ausbrüchen unter Geflügel, welche erhebliche wirtschaftliche Verluste nach sich ziehen können.

Ohne das Wissen, in welchem Umfang und welche Stämme bei Wildvögeln anzutreffen sind, ist das von ihnen ausgehende Gefährdungspotential für Wirtschaftsgeflügel und auch für Brieftaubenhaltungen nicht abzuschätzen (EFSA, 2007).

Ringeltauben besitzen auf Grund ihrer anzunehmenden Empfänglichkeit für APMV-1 (PLACIDI und SANTUCCI, 1954; KALETA und BALDAUF, 1988), ihrer hohen Anzahl in Deutschland, ihrer Nähe zum Wirtschaftsgeflügel und Ihres Migrationsverhaltens möglicherweise ein besonderes Potential, als Vektor für APMV-1 zu fungieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine über einen Zeitraum von zwei Jahren in Nordrhein Westfalen gesammelte Stichprobe mit einem Umfang von 241 geschossenen Ringeltauben serologisch und virologisch auf die Präsenz aviärer Paramyxoviren untersucht werden.

### **5.2 UNTERSUCHUNG DER RINGELTAUBEN**

#### **5.2.1 Probennahme**

Das gewählte Gebiet für die Beprobung der Ringeltauben lag in Nordrhein Westfalen, wo innerhalb Deutschlands die höchste Populationsdichte unter Ringeltauben herrscht. Dies wird durch die jährlich zunehmenden Jagdstrecken widerspiegelt (DJV, 2005). Diese ist von 1987 bis 2005 von ca. 300.000 auf über 600.000 erlegte

Ringeltauben angestiegen und hat sich damit innerhalb von 18 Jahren mehr als verdoppelt.

Für die Beprobung einer Ringeltaubenpopulation kommen nur erlegte Tiere oder Lebendfänge in Betracht. Lebendfänge bringen einen enormen Aufwand mit sich und müssten eigens für die Untersuchung durchgeführt werden. Ringeltauben werden aber unabhängig davon jährlich, auf Grund des landwirtschaftlichen Schadens den sie verursachen, geschossen. Der Vorteil der Beprobung von geschossenen Tauben lag weiter darin, dass viele Tauben in einem relativ kurzen Zeitraum aus einer bestimmten Gruppe (Schwarm) zur Verfügung standen und so eine Stichprobe einer Population untersucht werden konnte.

Der Nachteil bestand in einem relativ eingeschränkten Beprobungszeitraum in den Sommermonaten, da sich die Ringeltauben nur dann in großen Schwärmen auf Äckern aufhalten, wo sie erlegt werden können. Des Weiteren konnten die Proben nicht steril entnommen werden. Insbesondere bei der Blutentnahme ist zu beachten, dass durch die Schrotgeschosse teilweise Darm verletzt wurde, was zum Austritt von Darminhalt führte und damit zu bakteriellen Verunreinigung von Blut und Organproben führen konnte. Auch bei verzögerter Probennahme konnte es begünstigt durch die warmen Sommertemperaturen schnell zum Austritt von Darmbakterien und damit zur Kontamination des Probenmaterials kommen. Bakterielle Kontamination der Proben hat vor allem einen möglichen Einfluss auf den Virusnachweis mittels Anzucht und die serologischen Testverfahren, während sie die RT-PCR nicht wesentlich beeinflusst. Auch war durch meist schon geronnenes Blut eine Serumgewinnung erschwert. Als Alternative zu Serum steht daher die Gewinnung von antikörperhaltigem Fleischsaft in der Erprobung (Schweine-Salmonellen-Verordnung, 2007).

Unter den geschossenen Tauben befanden sich etwas mehr weibliche als männliche Tiere (53% zu 47%) Dies entspricht einer Untersuchung an geschossenen Tauben in England und Schottland 1943-1945, wo nach monatlichen Untersuchungen auch ein relativ ausgeglichenes Geschlechterverhältnis festgestellt wurde. Schwankungen konnten eine Überzahl sowohl männlicher als auch weiblicher Individuen bedingen (COLQUHOUN, 1951). In der untersuchten Ringeltaubenpopulation waren insgesamt 5% Jungtauben zu vermerken. Dieses Ergebnis liegt leicht unter den Angaben einer

Untersuchung aus Oxford, die in den Monaten Juli und August, in denen hier die Hauptbeprobung (88%) stattfand, durchschnittlich 9% Jungtauben feststellte (COLQUHOUN, 1951). In den späteren Monaten stiegen diese Zahlen an auf bis zu 20%. Das Gewicht von Jungtauben reicht von durchschnittlich ca. 300 g, wenn sie mit etwa 3-4 Wochen das Nest verlassen bis 380g im Alter von etwa 10 Wochen. Auch diese Angaben sind mit den hier festgestellten  $356 \pm 26g$  vergleichbar und lassen vermuten, dass es sich um Jungtauben zwischen 6 und 10 Wochen handelte. Alle Tauben erschienen klinisch unauffällig. Der Ernährungszustand und somit das Gewicht der Tauben entsprach mit ca. 500 g den Normalwerten für Ringeltauben zu dieser Jahreszeit (COLQUHOUN, 1951, BETTMANN, 1973, SCHERNER, 1980). Bei der Probennahme waren bei fünf Tauben Leberveränderungen zu vermerken, die möglicherweise auf chronische bakterielle Infektionen zurückzuführen waren. Des Weiteren ergaben sich durch Schussverletzungen des Darms Zufallsbefunde ausgewanderter Bandwürmer, die jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen waren und daher nicht näher spezifiziert wurden.

Eine APMV-1 Infektion der Tauben konnte auf Grund des klinischen und pathologische Bildes nicht ausgeschlossen werden. Bei Haustauben (*Columba livia*) wird oftmals weder durch PPMV-1 noch durch velogene APMV-1 ein klinisches Krankheitsbild erzeugt (ALEXANDER und PARSONS, 1984, DE OLIVEIRA TORRES CARRASCO et al., 2007). Auch ein unauffälliges Bild während der Probennahme spricht nicht gegen eine APMV-Infektion. So werden bei APMV-Infektionen zumeist nur wenig makroskopisch erkennbare Veränderungen der Organe festgestellt (KALETA 1992a).

Trotz Einschränkungen ist die Beprobung von erlegten Tauben als geeignet anzusehen um eine generelle Einschätzung des Infektionsstatus zu treffen. Für die Organuntersuchung mittels RT-PCR sind die Gewebeproben gut geeignet, und auch wenn einige Serumproben nicht auszuwerten waren, so steht der Mehraufwand einer Probengewinnung durch Lebendfänge nicht im Verhältnis zu den nicht verwertbaren Ergebnissen einzelner Proben, da nicht die Einzeltierdiagnostik sondern eine allgemeine Prävalenzschätzung angestrebt wurde. Es handelte sich bei den Tauben um eine normal zusammengesetzte Population, die zwar nicht frei von Infektionen war, aber auch keinem seuchenhaften Geschehen unterlag.

### 5.2.2 Virologische Nachweisverfahren

Um aus infiziertem Gewebe Virus nachzuweisen, gibt es die Möglichkeit einer Virusisolierung und des Nachweises von Virusgenom mittels RRT-PCR.

Der RRT-PCR wurde hier der Vorzug gegeben, da es sich bei 241 Proben um einen großen Arbeits- und Kostenaufwand gehandelt hätte, mit allen Proben eine Anzucht durchzuführen. Auch kann durch die RRT-PCR Virusmaterial nachgewiesen werden, welches nicht mehr infektiös ist. Da nicht auszuschließen war, dass es durch teilweise verzögerte Probennahme zur Herabsetzung der Infektiösität des Erregers kam, was in einer Virusanzucht zu falsch negativen Ergebnissen geführt hätte, stellte die PCR das sicherere Verfahren dar. Auch im Falle bakterieller Kontamination des Probenmaterials war der RRT-PCR der Vorzug zu geben. Bei der RRT-PCR handelt es sich des Weiteren um eine sehr sensitive Methode, die gegenüber der Anzucht auch sehr geringe Mengen Virus nachweisen kann. Dadurch verlängert sich der Zeitraum der Nachweismöglichkeit in infiziertem Gewebe und eine Detektion von subklinischen Infektionen mit nur geringer Virusreplikation ist eher möglich (BARBEZANGE und JESTIN, 2003). Eine Viruscharakterisierung ist über die RRT-PCR allerdings nur bedingt möglich, weshalb an in der RRT-PCR positive Ergebnisse eine Anzucht zur weiteren Differenzierung anzuschließen gewesen wäre. Das Ergebnis der RRT-PCR war bei allen Proben und für beide verwendeten Protokolle negativ.

Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, da auch hier bei hohen Stichprobenzahlen aus Tauben nur selten Virus isoliert oder mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte (LILLEHAUG et al., 2005; Kim et al., 2008). So fanden KIM et al. (2008) in einer Stichprobe von 1416 Tauben nur 15 APMV-1 Isolate. Hier wurden außerdem 10 von 15 Isolaten während der kälteren Monate Oktober bis April gewonnen, obwohl der Großteil der Stichproben aus den wärmeren Monaten Mai bis September stammte. Die hier untersuchten Proben von Ringeltauben stammten aus den Sommermonaten.

Handelte es sich bei den untersuchten Tauben gezielt um erkrankte oder tote Tiere, oder fanden die Isolationen zu Zeiten aktueller Seuchenzüge statt, so konnte häufiger APMV-1 aus Tauben isoliert werden (ALEXANDER, 1986; HLINAK et al.,



1998; WERNER et al., 1999). Bei den hier untersuchten Tauben entstammten die Proben jedoch einer Population ohne erkennbare Krankheitssymptome.

Einen Hinweis auf das möglicherweise seltene Gelingen eines Virusnachweises selbst bei Seuchengeschehen gibt auch eine Studie aus Norwegen. Hier wurde versucht aus 100 verwilderten Haustauben APMV-1 nachzuweisen. Hierfür wurden Tauben eingefangen und eine Kloakentupferprobe entnommen, die mittels PCR und Virusanzucht untersucht wurden. Ein Virusnachweis gelang nicht, obwohl im gleichen Jahr in Norwegen ein Ausbruch unter Tauben statt gefunden hatte (LILLEHAUG et al., 2005).

In der RT-PCR wurde Nierengewebe untersucht, welches im Vergleich zu anderen Organen auf Grund des Erregertropismus gut für den Nachweis von Virusgenom geeignet ist (BARBEZANGE und JESTIN, 2003). Dies gelang nach experimenteller Infektion aus diesem Gewebe für 24 Tage bei allen untersuchten Tauben. Aus anderen Organe wie Leber oder Pankreas konnten hingegen nur bis zum 10. Tag p.i. Virusgenom sicher nachgewiesen werden. Die gewählte Methode der M Real time RT-PCR nach WISE und Mitarb. (2003) ist geeignet, um APMV-1 des Genotyp II, worunter auch PPMV-1 einzugruppiert ist, nachzuweisen. Auch mit der angewandten NP-Real time RT-PCR (WÄCKERLIN, 2009), ist ein Nachweis von PPMV-1 und anderen APMV-1-Stämmen möglich. Die Sensitivität zum Nachweis von APMV-1 in der angewendeten RT-PCR ist sehr hoch, so dass Virusgenom ab einer Menge von 10 Einfeldigen Dosen 50 (EID50) nachgewiesen werden kann (WISE et al., 2003).

Eine APMV Infektion der Ringeltauben kann durch diese Untersuchungen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Durch die verwendeten Protokolle wird nur APMV der Klasse-II, darunter auch PPMV-1 nachgewiesen, jedoch keine anderen APMV-1 der Klasse-I. Der Klasse II sind sowohl die klassischen Impfstämme, als auch die APMV-1 Stämme der vergangenen und aktuellen ND-Ausbrüche zugeordnet. Demgegenüber wird die als phylogenetisch älter einzustufende Klasse-I zumeist aus frei lebendem Wassergeflügel isoliert (GLOBIG, 2005). Diese APMV-1 sind als apathogen bzw. lentogen einzuordnen. Zudem konnten durch die negativen RT-PCR Nachweise eine lokale APMV-Infektion bei den Ringeltauben nicht sicher ausgeschlossen werden. So bleibt eine Infektion mit lentogenen Stämmen, zu

welchen auch Hühnerimpfstämme zählen, auf das Epithel von Respirations- oder Digestionstrakt beschränkt (ROTT, 1979) Eine derartige Infektion wurde durch die Untersuchung der Nieren nicht erfasst. Des Weiteren können Untersuchungen mittels RRT-PCR nur Hinweise auf akute, nicht aber auf bereits abgeklungene Infektionen geben. Eine akute Infektion mit den für die Seuchenzüge verantwortlichen PPMV-1 und anderen mesogenen bzw. lentogenen APMV-1 der Klasse II, denen der Schwerpunkt der Untersuchung galt, konnte jedoch ausgeschlossen werden.

### 5.2.3 Serologische Nachweisverfahren

Einen größeren Zeitrahmen für den Nachweis stattgefundener APMV-Infektionen bieten serologische Untersuchungen. Wie lange nach einer natürlichen Infektion ein solcher Nachweis möglich ist, ist nicht bekannt. Allerdings induzierten Impfungen von Tauben im HAH messbare Antikörper von bis zu mehr als einem Jahr, wenn auch in einem niedrigen Titerbereich von 3-4 (FORSTER et al., 2002). Bei erneuter Infektion stieg der Titer jedoch stark an. Da vermutet wird, dass PPMV-1 zumindest unter Haustauben endemisch verbreitet ist (WERNER et al., 1999) ist durch einen Boostereffekt durch Reinfektionen zu rechnen. Da es sich bei den untersuchten Tauben um Wildtiere handelt, besteht hier die Verwechslungsmöglichkeit mit Impfantikörpern nicht.

Für Ringeltauben gibt es keine evaluierten Tests zur Diagnose von APMV-1 Infektionen. Des Weiteren stehen keine Referenzseren dieser Spezies zur Verfügung, weshalb auf Seren der Spezies *Columba livia* zurückgegriffen wurde. Dies erschwert die Beurteilung der Testverfahren, da diese Seren in ihrer Reaktivität nicht direkt mit denen der Wildvögel vergleichbar sind. Des Weiteren stammten die untersuchten Seren von geschossenen Vögeln, wodurch keine sterile Blutprobenentnahme gewährleistet werden konnten. Grundsätzlich besteht bei serologischen Untersuchungen das Risiko von unspezifischen Hintergrundreaktionen oder Kreuzreaktionen durch andere Antikörper als die gegen APMV-1 gerichteten. Möglicher Weise verursachten Seren mit bakterieller Kontamination hohe Hintergrundreaktionen. Auch als Rheumafaktoren bezeichnete Autoantikörper,

gebildet in Folge chronischer Entzündungen, können unspezifische Bindungsreaktionen verursachen und zu einer Reaktivität in den Tests führen (MILLER und LEVINSON, 1996). Zumindest bei fünf Tauben waren chronische Hepatitiden feststellbar, und auch die Belastung durch Parasiten ist bei Wildvögeln kein seltenes Geschehen. Durch verschiedene Vorbehandlungen der Seren könnten einiger dieser unspezifischen Reaktivitäten unterbunden werden, jedoch sind sie oft sehr aufwändig und für die Untersuchung von Seren in hoher Stückzahl seltener angewendet.

Serologische Untersuchungen wurden mittels Western Blot, ELISA und HAH durchgeführt.

Unter diesen drei Testverfahren wurde der Western Blot als sicherstes Verfahren zur Identifizierung positiver und negativer Seren bewertet. Dieser weist neben einer hohen Sensitivität auch eine hohe Spezifität auf. Da die viralen Proteine im Western Blot aufgetrennt werden, kann beurteilt werden an welche Bestandteile die Serumantikörper binden. Durch eine Darstellung einer enzymbedingten Lichtemission im Falle von Antikörperpräsenz kann diese Reaktion mittels Röntgenfilm im Gegensatz zu anderen Testverfahren visuell spezifiziert werden. Dadurch können unspezifische Hintergrundreaktionen von virusspezifischen Antikörperbindungsreaktionen unterschieden werden. Durch Versuche mit monoklonalen Antikörpern wurden die Proteine von APMV-1 LaSota identifiziert. Unspezifische Kreuzreaktionen mit den Proteinen der Amnioallantoisflüssigkeit in denen das Virus angezüchtet wurde, wurden untersucht. Durch vergleichende Untersuchung einer AIV-H5N1 Viruspräparation kam es im Bereich von etwa 45-50 kDa zu einer Kreuzreaktion durch die Hyperimmunseren, die zu Verwechslung mit virusspezifischen Banden führen konnte. Allerdings stammten die Testseren von immunisierten Tieren, so dass bei Ihnen eine Antikörperreaktion auf Proteine der Amnioalantoisflüssigkeit in Folge der Impfung häufiger anzutreffen ist. Eine Coomassiefärbung der aufgetrennten Virus und Allantoisflüssigkeitsproteine im Vergleich machte deutlich, dass die Hauptproteine auf verschiedenen Ebenen lagen und die Virusreinigung von Eiproteinen weitgehend frei war. Daher konnte angenommen werden, dass im Western Blot sichtbare Banden durch spezifische

Bindungsreaktionen der Serumantikörper an das Virusprotein hervorgerufen wurden. Um jedoch Verwechslungen auszuschließen, wurden später einzeln auftretende Banden in diesem Bereich als nicht virusspezifisch gewertet.

Kreuzreaktionen von gegen andere APMV-Serotypen gerichteten Antikörpern und dem APMV-1 konnten im Western Blot spezifiziert werden, was im HAH und im ELISA bereits von einigen Autoren beschrieben wurde (ALEXANDER et al., 1983 a, b.; ADAIR et al., 1989). Die Hyperimmunseren lieferten aber ein zumeist unvollständiges Bandenmuster, reagierten also nicht mit allen Virusbestandteilen. Die Hauptreaktion von APMV-1 Seren lag im Bereich der oberen Doppelbande, die die Proteine F1, P und NP repräsentieren, sowie des M-Proteins. Die Bindung an das HN-Protein und den unteren Teil der Doppelbande war weniger prominent. Eine Verwechslungsmöglichkeit mit APMV-1 war durch APMV-7 spezifischen Antikörpern gegeben, die wie das APMV-1 Hyperimmunserum alle vier Virusbanden erkannte. Jedoch fiel die Reaktion mit der Doppelbande hier im Vergleich wesentlich schwächer aus. Eine stärkere Reaktion wurde durch APMV-9 spezifische Antikörper verursacht, jedoch wurden hier andere Virusbanden nicht erkannt. Dadurch sind tendenziell durch Antikörper gegen andere APMV-Stämme hervorgerufene Kreuzreaktionen von Reaktionen der APMV-1 spezifischen Antikörpern zu unterscheiden. Am eindeutigsten ist dies möglich, wenn das Testserum alle 4 virusspezifischen Banden aufweist und die Doppelbande von starker Intensität ist.

Die Titration eines positiven Taubenserums zeigte eine besonders starke Reaktivität im Bereich der virusspezifischen Doppelbande, die auch bei steigender Verdünnung als letztes sichtbar blieb. Auch bei allen positiven Ringeltaubenserum die titriert wurden, blieb die Doppelbande im Bereich der Proteine NP, P und F1 bei hoher Serumverdünnung sichtbar. Da offenbar die Hauptreaktion der positiver APMV-1 Seren in diesem Bereich stattfand, wurde dies als Hauptbewertungsgrundlage für die APMV spezifische Reaktivität der Testseren herangezogen. Bei weiterer Verdünnung war nur noch der obere Teil der Doppelbande zu erkennen, der auch bei definiert negativen Seren auftrat. Daher konnten Seren, die nur diese Bande aufwiesen nicht eindeutig zugeteilt werden. Aufgrund der Anfälligkeit für Kreuzreaktionen in diesem kDa-Bereich durch das definiert negative Taubenserum und durch die Hyperimmunseren, sowohl mit Virusproteinen als auch der Eiflüssigkeit, wurden diese Seren letztendlich negativ gewertet. Als fraglich beurteilt wurden Seren, die

---

zwar virusspezifische Banden aufwiesen, aber nicht die vollständige Doppelbande. Damit erfüllten sie weder die Kriterien für eine positive, noch für eine negative Beurteilung. Unter Umständen handelte es sich hier um positive Seren und es bestand ein Zusammenhang des abweichenden Bandenmusters mit dem Infektionszeitpunkt. Bei der Titration des positiven Taubenserums veränderte sich nur die Anzahl der vorhandenen Antikörper, nicht aber deren Zusammensetzung. Daher verhielt sich das Bandenmuster in Abhängigkeit von der schwerpunktmäßigen Verteilung der Antikörper in diesem Serum. Da die Zusammensetzung der Antikörper eher vom Infektionszeitpunkt abhängt, könnten verschiedene Bandenmuster im Western Blot erzeugt werden. Auch bei immunisierten Enten und Gänsen war je nach Infektionszeitpunkt 3-10 Wochen p.v. nicht immer die komplette Doppelbande im Western Blot sichtbar (KOTHLOW et al., 2008; HÄUSLAIGNER et al., 2009). Da die Seren aber nicht sicher eingeordnet werden konnten, bildeten sie eine eigene Gruppe von fraglichen Seren. Einige Seren riefen bei diesem Test so starke Hintergrundreaktionen hervor, dass die ganze Membran geschwärzt war. Damit konnten virusspezifische Banden nicht mehr erkannt werden und eine Bewertung dieser Seren war unmöglich. Möglicherweise waren diese starken Hintergrundreaktionen bakteriell bedingt. Auch diese Seren wurden der fraglichen Gruppe zugeordnet.

Basierend auf diesem Bewertungsschema konnten mittels Western Blot 93 Seren als APMV-positiv identifiziert werden. Der Western Blot gibt damit an, wie viele untersuchte Seren der Population mindestens positiv zu bewerten sind. Je nachdem, wie viele der fraglichen Seren zusätzlich in den positiven Bereich fallen, wäre das tatsächliche Ergebnis für die Population nach oben zu korrigieren. Durch die sich daraus ergebende minimale und maximale Anzahl positiver Seren kann ein Bereich angegeben werden, in welchem sich der tatsächliche Wert der positiven Seren befindet.

Da im ELISA mit starker Verdünnung der Reagenzien gearbeitet wird, können schon kleine Abweichungen zu stark unterschiedlichen Ergebnissen in den OD-Werten bei gleicher Antikörperkonzentration führen. Um diese Unsicherheit auszuschließen und um die Ergebnisse der einzelnen ELISA-Tests untereinander vergleichbar zu machen, wurde immer dasselbe positive Taubenserum mitgeführt. Die gemessenen

Werte der Testseren wurden in Relation zu dem Wert dieses Serums gesetzt und als S/P-Wert bezeichnet. Im ELISA kam es zu einer Verteilung der bei den Ringeltaubenseren gemessenen S/P-Werte zwischen 0 und 1. Zusätzlich getestete definiert negative Seren aus SPF Tauben wiesen nur sehr geringe S/P-Werte auf. Verglichen mit diesen Seren wiesen fast alle Wildtaubenseren deutlich höhere S/P-Werte auf und fielen in den Bereich für eine positive Bewertung.

Wie im Western Blot kann es auch im ELISA zu unspezifischen Reaktionen kommen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen. Es war fraglich, ob diese hohen Werte im ELISA tatsächlich auf spezifische Antikörperreaktionen oder auf unspezifische Hintergrundreaktionen zurückzuführen waren, denn diese Testergebnisse waren mit den im Western Blot gewonnenen Erkenntnissen nicht stimmig. Dies deutet darauf hin, dass sich die Ringeltaubenseren von den Seren der SPF-Tauben durch hohe Hintergrundreaktionen zu stark abhoben und die gesetzte Ausschlussgrenze zu niedrig war. Daher wurden viele Seren falsch APMV-seropositiv erkannt. Im ELISA können hämolytische oder bakteriell verunreinigte Seren unspezifische Reaktionen auslösen (WARFORD, 1992). Beide Tatsachen traten in den Testseren bedingt durch die Voraussetzungen bei der Beprobung oft auf. Des Weiteren besteht im ELISA zumindest bei Hühnern in den gemessenen OD-Werten eine gewisse Altersabhängigkeit (ADAIR et al., 1989). Wiesen bei einer Studie 50 untersuchte Negativseren von 7 Wochen alten Hühnern einen durchschnittlichen OD-Wert von 0,095 auf, so war bis zu 40 Woche ein kontinuierlicher Anstieg bis zu durchschnittlich 0,268 zu verzeichnen. Auch bei anderen Vogelspezies wurde bereits eine solche Altersabhängigkeit festgestellt. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass es sich bei den untersuchten Tauben fast ausschließlich um Alttauben handelte, die ein Alter von etwa 16 Jahren erreichen können (SCHERNER, 1980). Um einen besseren Wert für die Ausschlussgrenze bei dem ELISA für die Herausstellung einer möglichst hohen Anzahl an richtigen Ergebnissen wurden die Werte des ELISA mit den Ergebnissen des Western Blot verglichen. Hierfür wurden nur die Ergebnisse der Seren herangezogen, die im Western Blot sicher zu beurteilen waren.

Die S/P-Werte des ELISA lagen bei Western Blot positiv bewerteten Seren im Durchschnitt signifikant höher als die negativ bewerteten Seren, was die jeweiligen Ergebnisse insgesamt bestätigt. Offenbar kommt es im ELISA zu unterschiedlich

starken Hintergrundreaktionen bei den Seren. Diese Hintergrundreaktionen schienen jedoch nicht an die Spezies gebunden zu sein, da sie nicht generell und bei jedem Serum auftraten. So gab es auch WB-negative und sogar WB-positive Seren mit relativ niedrigen S/P-Werten.

Dies erschwerte eine eindeutige Identifizierung positiver und negativer Seren im ELISA durch eine festgelegte Ausschlussgrenze. Daher eignet er sich hier nicht zu Einzeltieranalyse, kann aber zur Prävalenzschätzung einer Population eingesetzt werden. Dafür wurde durch die ROC-Analyse die beste Ausschlussgrenze für diesen Test ermittelt. Diese ergab eine Sensitivität des Testes von 74% und eine Spezifität von 70%. Die niedrigere Sensitivität des ELISA bei dieser Ausschlussgrenze wurde in Titrationsversuchen mit APMV-positiven Seren bestätigt. Mit der Kenntnis, wie hoch die Sensitivität und Spezifität des ELISA lag, konnte im Anschluss auch durch diesen Test eine Einschätzung der tatsächlichen Prävalenz gegeben werden, deren Konfidenzintervall 0,95 betrug. Dieses Ergebnis fiel in den Bereich des durch den WB ermittelten Intervalls.

Im HAH reagierten insgesamt 35 Seren positiv mit dem Antigen APMV-1. Dabei stellte sich bei den Untersuchungen nur ein einziges Serum heraus, welches im HAH nach den Vorgaben der Richtlinie 92/66/ EWG positiv reagierte. Wertet man auch die Seren mit geringen Titerzahlen als positiv, so entspricht das etwa 15% der getesteten Seren. Dieses Ergebnis fällt etwas geringer aus als das von HLINAK et al (1998), die zwischen 1992 und 1997 insgesamt 321 Seren von Haus und Straßentauben mittels HAH mit dem Antigen LaSota untersuchten und eine Seroprävalenz von etwa 20% feststellten. Auch hier flossen Seren mit Titer unter vier in die Bewertung ein. Hier waren 3% der untersuchten Seren nach der Richtlinie positiv, wobei außerdem bedacht werden muss, dass sich hier möglicherweise auch geimpfte Tiere unter den Beprobten befanden. So bestand hier eine Verwechslungsmöglichkeit von Infektions- mit Impftitern. Diese Untersuchung fand auch zu einem Zeitpunkt statt, wo es in Deutschland stellenweise zu ND-Ausbrüchen bei Wirtschaftsgeflügel kam. Andere Autoren sehen hier einen Zusammenhang zwischen aktuellem Seuchengeschehen und dem Nachweis von APMV-1 Antikörpern bei Tauben. Diese Autoren konnten bei der Untersuchung von Taubenserum in Zeiten von ND-Freiheit mittels HAH gar keine APMV-1 Antikörper

feststellen (KALETA und HEFFELS; 1982 MALDONADO et al., 1994). Ein Serum bzw. 6 Seren verursachten die Hemmung der Agglutination bis zu einem Titer von drei mit den Antigenen APMV-2 bzw. -8. Während Antikörper gegen APMV-2 mittels HAH schon häufiger bei Tauben und auch schon bei Ringeltauben nachgewiesen werden konnten (KALETA und HEFFELS, 1982; MALDONADO et al., 1994), gibt es bisher noch keine solche Nachweise für APMV-8 spezifische Antikörper. Bei Überprüfung der Testergebnisse im HAH anhand der Western Blot Ergebnisse ließ sich aber feststellen, dass gerade in den unteren Titerstufen eine hohe Anzahl der positiven Ergebnisse unspezifischen Reaktionen zuzuordnen waren. Erst ab einem Titer von vier schien der HAH die Seren sicher als positiv zu identifizieren. Im Vergleich mit dem Western Blot konnte weiter festgestellt werden, dass viele positive Seren durch den HAH nicht erkannt wurden. Anhand der Titration eines positiven Taubenserums, stellte sich im Western Blot eine weitaus höhere Sensitivität als im HAH heraus. Hier war mit dem Antigen APMV-1-LaSota bereits bei einer Verdünnung von 1:32 und mit PPMV-1 bei einer Verdünnung von 1:256 die Nachweisgrenze erreicht. Dasselbe Serum konnte im Western Blot bis zu einer Verdünnung von 1:800 noch mit vier Virusbanden als APMV-1 spezifisch erkannt werden und bis zu einer Verdünnung von 1:32000 ließen sich noch zwei Virusbanden feststellen, die noch zu einer positiven Bewertung der Testseren geführt hätte. Daher ist es möglich, dass auf Grund mangelnder Sensitivität weit weniger Seren positiv identifiziert werden konnten als durch den WB.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass durch den HAH nur gegen das HN-Protein spezifische Antikörper detektiert werden. Demgegenüber werden im Western Blot und auch in ELISA auch gegen andere Virusproteine gerichtete Antikörper detektiert. In einer anderen Studie an Enten und Gänsen, konnten mittels ELISA nach einer Impfung positive Seren detektiert werden, die durch den HAH negativ beurteilt wurden. Während anfangs die Sensitivität beider Tests vergleichbar war, kam es bereits drei Wochen nach der Impfung zu einem Abfall der Sensitivität im HAH. Hier konnten nur noch 75,8 % der Seren als positiv erkannt werden, während der ELISA 97% der positiven Seren detektierte. Es konnten neben dem Einfluss des Infektionszeitpunktes auf die Sensitivität des ELISA auch durch die Versuchstiere bedingte individuelle Schwankungen festgestellt werden (HÄUSELAIGNER et al., 2009). Möglicherweise kommt es auch im Zuge von subklinischen Infektionen zu

---



einer geringen Virusreplikation und damit zu einer überwiegend geringen Antikörperbildung, die durch den HAH nicht detektiert wird. Auch GRUND (2004) stellte bei subklinisch infizierten Graupapageien, die mittels ELISA und Western Blot als APMV-1 positiv identifiziert werden konnten, im HAH ein negatives Ergebnis fest. Eine sichere Beurteilung des Antikörperstatus der Ringeltauben mittels HAH war nicht möglich. Zwar gab das stark reagierende Serum einen Hinweis auf die mögliche Präsenz von Antikörpern, jedoch waren die Seren, die Hämagglutinationshemmung in niedrigen Titerstufen verursachten, oft negativ einzuordnen und umgekehrt wurde eine hohe Anzahl positiver Seren durch den HAH nicht erkannt. Allerdings ist zu bemerken, dass die zu verzeichnenden Reaktionen fast ausschließlich mit APMV-1 stattfanden und hier verstärkt mit dem Antigen APMV-1 LaSota. Auch die einzig starke Reaktion fand mit diesem Antigen statt.

### **5.3 Epidemiologische Bedeutung der Ringeltauben für APMV**

In allen serologischen Testverfahren konnten Hinweise auf das Vorkommen von APMV bei Ringeltauben gewonnen werden.

Durch die Kombination von Western Blot und ELISA könnte eine Prävalenzschätzung vorgenommen werden, deren Konfidenzintervall bei 95% liegt. Für das für das Jahr 2007 liegt dieser Wert bei 51% und bei 40% für das Jahr 2008. Damit scheint ein bemerkenswerter Anteil der Ringeltaubenpopulation sich immunologisch mit dem Erreger auseinander gesetzt zu haben.

Da Haustauben und Ringeltauben, bei denen APMV-1 oft isoliert wird, derselben Gattung angehören und sie sich auch miteinander vergesellschaften ist damit zu rechnen, dass ähnliche Virusinfektionen bei Ihnen stattfinden können.

Wenn auch der APMV-Serotyp nicht sicher charakterisiert werden konnte, so ergeben sich doch an Hand der Bandenmuster im Western Blot sowie der Hauptreaktivität der Seren mit APMV-1 im HAH Hinweise auf stattgefundene Infektionen mit APMV-1. Möglicher Weise handelte es sich hierbei eher um lentogene Stämme, da aus der letzten Zeit keine Berichte über eine durch eine solche Krankheit induzierte erhöhte Sterblichkeit unter Ringeltauben vorliegen. Neben der Klasse-I ist auch eine Infektion mit Hühnerimpfstämmen in Betracht zu

ziehen. Lentogene Lebendimpfstämme werden vor allem bei kommerzieller Hühner- und Putenhaltung eingesetzt. Durch diese wird das Virus auch ausgeschieden und wäre zum Beispiel durch den Kot der Tiere übertragbar.

In dem beprobten Gebiet wird vermehrt Hühnerhobbyhaltung betrieben. Diese Hühner werden teils auf offenem Gelände gehalten und können so direkt mit den Tauben in Kontakt kommen. Bei größeren Betrieben ist vorstellbar, dass Ringeltauben die Lagerungsstätte für Hühnerexkremete (Misthaufen), nach übrig gebliebenen Futterbestandteilen absuchen oder dass durch Düngung der Felder mit Hühnerexkrementen eine Exposition des Virus stattfindet.

Da APMV-1 bei Ringeltauben zu finden ist, können sie eine Rolle bei der Erregerübertragung und Verbreitung unter Wirtschaftsgeflügel spielen.

Ringeltauben treten schwarmhaft auf und vergesellschaften sich in landwirtschaftlich geprägten Lebensräumen oft mit anderen frei lebenden Vögeln wie Haustauben, Krähen und Sperlingsvögeln, die ebenfalls infiziert sein können (KALETA und BALDAUF, 1988). So kann zwischen diesen Spezies ein Erregeraustausch stattfinden. Ringeltauben könnten daher auch als Indikatorspezies für seuchenrelevante APMV-1 in der Wildvogelpopulation dienen.

## 6. Zusammenfassung

Das aviäre Paramyxovirus-1 (APMV-1) löst weltweit vor allem bei Hühnern und Puten die verlustreiche Tierseuche Newcastle Disease aus. Aus Tauben (*Columba livia*) wurde bisher überwiegend die meist mesogene Variante PPMV-1 isoliert, daneben konnten auch andere, darunter velogenen APMV-1 Stämme, isoliert werden. Wenig bekannt ist über das Vorkommen und den Infektionsstatus von APMV-1 bei Wildtauben, ihre mögliche epidemiologische Bedeutung ist daher ungeklärt. Um einen Einblick in das APMV-1 Infektionsgeschehen bei der in Deutschland am häufigsten vorkommenden Spezies zu erlangen, wurden 241 Ringeltauben (*Columba palumbus*) untersucht, die von Jägern nach Abschuss hierfür zur Verfügung gestellt wurden. Die Beprobung fand in den Monaten Juli bis Oktober der Jahre 2007 und 2008 statt. Die untersuchte Population setzte sich etwa zu gleichen Teilen aus männlichen und weiblichen Individuen zusammen, der Jungvogelanteil betrug etwa 5%. Das Verhalten der Ringeltauben sowie das durchschnittliche Gewicht der Alttiere von  $520\text{g}\pm 29\text{g}$  ließen keine Erkrankungen vermuten. Hinweise auf subklinische Erkrankungen bzw. eine parasitäre Infestation ergaben sich aber während der Beprobung. Hier kam es zur Feststellung chronischen Hepatitiden bei fünf Tieren. Des Weiteren konnte als Zufallsbefund bei 15 Tieren ein Befall mit Bandwürmern festgestellt werden, die aufgrund von Schussverletzungen des Darmes ausgewandert waren.

In der RT-PCR wurden Nierenproben untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene für den Nachweis von APMV-1 geeignete Protokolle verwendet. Bei allen Proben und mit beiden Protokollen war keine APMV-1 spezifische Virus-RNA nachweisbar.

Im Westernblot wurden mittels monoklonaler Antikörper APMV-1 virusspezifische Proteinbanden charakterisiert. Versuche mit gegen verschiedene APMV-Serotypen gerichteten Hyperimmunseren, zeigten im Westernblot vor allem mit der den Virusproteinen P/NP/F1 zugeordneten, sowie der mit der M-Protein assoziierten Bande Kreuzreaktivität. Damit war tendenziell eine Unterscheidung zwischen Reaktionen APMV-1 spezifischer Antikörper, die alle vier Virusbanden mit

Schwerpunkt der P/NP/F1 assoziierten Doppelbande erkannten und anderen APMV-Serotyp spezifischen Antikörperreaktionen möglich.

Eine Verwechslungsmöglichkeit war am ehesten mit APMV-7 spezifischen Antikörpern gegeben, die alle vier Virusbanden erkannten. Jedoch war die Virusdoppelbande hier von schwacher Intensität. Die Doppelbande trat in starker Intensität mit dem APMV-9 spezifischen Hyperimmunserum auf, jedoch wurden hier keine weiteren Virusbanden erkannt. Am sichersten konnten somit Bandenmuster als APMV-1 spezifisch bezeichnet werden, die alle vier Virusbanden und darunter die Doppelbande in hoher Intensität aufwiesen. Die getesteten Ringeltaubenserum zeigten Bandenmuster, die in Anzahl und Intensität variierten. Im Vergleich zu dem positiven Taubenserum sowie einem negativen Kontrollserum kam es zu einer Einteilung der Seren in verschiedene Gruppen. So konnten 93 positive Seren und 102 negative Seren ermittelt werden. Als fraglich eingestuft wurden 46 Seren mit abweichenden Bandenmuster oder zu hoher Hintergrundreaktivität.

Demgegenüber, basierend auf einer mit Hilfe von SPF-Seren ermittelten Ausschlussgrenze, wurden im ELISA 222 APMV-seropositive Tauben ermittelt. Da dies den Ergebnissen des Westernblot widersprach wurde angenommen, dass diese Ausschlussgrenze für die Wildvogelspezies zu niedrig war und viele Seren falsch positiv erkannt wurden. Um im ELISA zu einem verlässlicheren Ergebnis zu kommen, wurde Mittels ROC-Analyse eine Ausschlussgrenze errechnet, die die höchst mögliche Sicherheit für den ELISA bedingte. Als Bezugspunkt für die Analyse wurden Seren ausgewählt, die im Westernblot sicher zugeteilt werden konnten. Bei der ermittelten besten Ausschlussgrenze für den Test betrug die Sensitivität 74% und die Spezifität 70%. Durch Kombination des WB mit dem ELISA konnte eine Prävalenzschätzung vorgenommen werden. Mit bekannter Spezifität und Sensitivität des ELISA ließ sich aus den durch ihn ermittelten Werten die wahre Prävalenz berechnen. Diese betrug im Jahr 2007 51% und im Jahr 2008 40%. Diesen Werten konnte ein Konfidenzintervall von 95% zugeordnet werden.

Es wurden des Weiteren Untersuchungen mittels HAH durchgeführt. Nur ein Serum reagierte Serum positiv im Sinne der Verordnung 92/66/EWG und hemmte die Agglutination der Erythrozyten bis zu einer Titerstufe von 5 mit PPMV-1 bzw. 6 mit APMV-1 LaSota. Andere Reaktionen in niedrigen Titerstufen bis 3 fanden vor allem mit APMV-1, aber auch mit APMV-2 und -8 statt. Im Vergleich mit dem Westernblot

konnten diese aber zumeist nicht als positive Reaktion bestätigt werden, was auf unspezifische Reaktionen in diesen Titerstufen deutet.

Eine genaue Charakterisierung des für diese Antikörperprävalenzen ursächlichen Erregers konnte nicht vorgenommen werden. Jedoch geben Bandenmuster im Westernblot und Reaktionen im HAH einen Hinweis darauf, dass es sich dabei um APMV-1 handeln könnte.

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass die Ringeltaube als empfänglich für APMV-1 angesehen werden kann und eine beachtliche Antikörperprävalenz zeigt. Daher kommt sie möglicher Weise bei Seuchengeschehen als Vektor in Betracht. Da sie als Teilzieher weite Strecken zurücklegen kann, ist dieser Erkenntnis auch bei Ausbrüchen von ND in Nachbarländern Beachtung zu schenken.



## 6. SUMMARY

*Avian paramyxovirus* of the serotype APMV-1 is the causative agent of Newcastle Disease, a highly contagious animal disease associated with high losses, especially in chicken and turkey. Mostly mesogenic PPMV-1 strains have been isolated from pigeons (*Columba livia*) get isolation of other APMV-1 strains, including velogenic ones, has been described. There is little knowledge on the occurrence of the virus and infection status in wild pigeons, thus their epidemiological importance is unknown. To gain insight into the infection status, 241 common wood pigeons (*Columba palumbus*) which were contributed to the experiment by hunters, were examined. Sampling took place from July to October of 2007 / 2008.

The examined population consisted of approximately equal numbers of male and female animals and about 5 % of juveniles. Neither the behaviour nor the mean body weight of the adult birds (520 g  $\pm$  29 g) indicated any disease in the population. However, during the sampling indications of subclinical disease and parasite infestation were given. Five animals were diagnosed with chronic hepatitis. Furthermore, 15 birds were infected with tapeworms which were released into the body cavity as a result of shot injuries to the intestines.

Kidney samples were examined by real-time RT-PCR. Two protocols suitable for the detection of APMV-1 were used. Virus-specific RNA was not detected in any of the samples by either protocol. APMV-1 La Sota specific protein bands were characterized by Western blot with monoclonal antibodies. Western blot experiments conducted with hyperimmune sera directed against the different APMV-serotypes showed cross-reactives with the P/NP/F1 – as well as the M-protein associated bands. This made a differentiation of immunoreactions against other serotypes from APMV-1 specific antibody reaction possible, the latter displaying all four virus protein bands with the P/NP/F1 protein associated double band reacting strongest. The likelihood of confusion is highest with APM -7 antibodies, which detected all four virus-specific protein bands. However, the double band was weaker in reactivity compared to APMV-1 specific sera. This double band was displayed strongly with

APMV-9, yet no other virus protein bands were detected. The highest diagnostic security was given with a reaction pattern displaying all four bands and the double band at the highest intensity. The tested wood pigeon sera showed reaction patterns of varying number of bands and intensity. In comparison to positive and negative control pigeon sera, the woodpigeon sera were classified into the groups. This led to the identification of 93 positive and 102 negative sera. 46 sera were classified as questionable due to untypical reaction patterns or high background reactivity.

In comparison, using a threshold of 0,08 determined by examination of SPF-sera, ELISA testing detected 222 APMV-seropositive pigeons. Since this opposes the Westernblot results, it was assumed that the threshold used was too low for the examined wild bird species and many sera were diagnosed false positive. In order to reach a reasonable ELISA result, a new threshold was calculated by ROC analysis, resulting in the highest possible security ELISA results. Sera with a confirmed Westernblot result were used. The test reached a sensitivity of 74 % and specification of 70 % with this optimized threshold. A weaker sensitivity of the ELISA as compared to the Westernblot analysis could also be seen by titration of positive sera.

Combined results of Westernblot and ELISA made an assumption of prevalence possibility. With known sensitivity and specificity of the ELISA, three prevalences of 5 % in 2007 and 40 % in 2008 % could be determined at a confidence interval of 95%. Additionally, hemagglutination inhibition (HI) tests were conducted. Only one serum reacted positive according to the regulation 92 / 66 / EWG and inhibited erythrocyte agglutination up to a titer of 5 using PPMV-1 as antigen and 6 using APMV-1 La Sota. Other reactions with low titers up to 3 could be seen especially with APMV-1, but also with APMV-2 and -8. When compared to the Westernblot, most of these reactions could not be confirmed as specific positive.

A characterization of the agent causing these antibody prevalence could not be performed. However, the reaction patterns in Westernblot and HI reactivity provide evidence that this agent is most likely APMV-1. Due to strong HI reactivity, an immunoreaction against the vaccine strain LaSota seems possible.

Conclusively, wood pigeons are susceptible to APMV-1 and show remarkable antibody prevalence. Thus, their function as a vector in cases of disease outbreaks seems possible. As they cover large distances in migratory movements, the insights



obtained in this study also have to be taken into account in cases of ND outbreaks in neighbouring countries.



## 8. LITERATURVERZEICHNIS

2000/666/EG Entscheidung der Kommission von 16. Oktober 2000 zu Festlegung der Veterinärbedingungen und Veterinärbescheinigungen sowie Quarantänebedingungen für die Einfuhr von anderen Vogelarten als Geflügel. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft 2000; L278: pp 26-34".

92/66/EWG Council Directive of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease, Official Journal L 260, 5.9.1992, p1.

Adair, McNulty, T. C. and Burns (1989), "Quantitative estimation of Newcastle Disease Virus antibody levels in chickens and Turkeys by ELISA," *Avian Pathology* (18), pp. 175-192.

Al Falluj, M., Al Sheikly, F. and Tantawi, H (1979). "Viral encaphalomyelitis of pigeons: Pathology and vius isolation," *Avian Diseases* (23), p. 77.

Albonik, C., Gerdes, G., Kitching, J., Swanepoel, S., Romito, M. and Bisshop, S. (2008) "Characterization of pigeon paramyxoviruses (Newcastle disease virus) isolated in South Afrika from 2001 to 2006," *Ondersrepoort J Vet Res.* (75), pp. 147-152.

Aldous, E. W., Fuller, C. M., Mynn, J. K. and Alexander, D. J. (2004) "A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons.," *Avian Pathol* (33:2), , pp. 258-269.

Aldous, E. W., Mynn, J. K., Banks, J. and Alexander, D. J. (2003) "A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene.," *Avian Pathol* (32:3), pp. 239-256.

Alexander, D.J. (2001a) "Paramyxoviridae", In: Poultry Diseases. Eds: F. Jordan, M. Pattison., D. A. T. F.,4. ed., W.B. Saunders, pp. 257-271.

Alexander, D.J. (2001b) "Newcastle Disease, " *Avian Virology* (42), , pp. 5-22.

Alexander, D.J (1997)"Newcastle Disease and other avian paramyxoviridae infektions", In: Diseases of Poultry Eds.; Calnek, B.W., B. H. B. C. M. L. S. Y., Iowa State University Press, Ames, , pp. 541-561.

Alexander, D. J. (1989) "A manual for isolation and identification of avian pathogens", ED.:Avian Pathologists, A. A., INC, Kennet Sqare, pp. 114-120.

Alexander, D.J. (1988) "Newcastle Disease and other Paramamyxoviruses", *in* Newcastle Disease Ed.: Alexander, D.J., Kluwer Academic Publishers: Boston Dordrecht London, pp. 11-22.

Alexander, D.J, Hinshaw, V., Collins, M. and Yamane, N. (1983a) "Characterisation of viruses wich represent further distinct serotypes (PMV 8 and PMV9) of avian Paramyxoviruses," *Arch Virol* (78), pp. 29-36.

Alexander, D. J., Mackenzie, J. and Russel, P. (1986) "Two Types of Newcastle disease virus isolated from feral birds in Western Australia detected by monoclonal antibodies.," *Aust. Vet. j.* (63), pp. 356-367.

Alexander, D. J and Parsons, G. (1986) "Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-85.," *Avian Pathol* (15:3), pp. 487-493.

Alexander, D. J. and Parsons, G. (1984),"Avian paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 2 Pathogenicity experiments in pigeons and chickens," *Vet Rec* (114), pp. 446-469.

Alexander, D.J., Parsons, G. and Marshall, R. (1986) "Avian paramyxovirus type 1

---

infections of racing pigeons: 4 Laboratory assessment of vaccination," *Vet Rec* (118), , pp. 262-266.

Alexander, D. J. and Senne, D. (2008) "Newcastle Disease, other Paramyxovirus and Pneumovirus Infections", *in: Diseases of Poultry 12th Ed: Ed. Saif, Y., ed., Blackwell Publishing*, , pp. 75-116.

Alexander, D. J., Lister, S. A. and Wilson, G. W. (1986), "Avian paramyxovirus type 1 infection of racing pigeons: 5. Continued spread in 1984.," *Vet Rec* (118:15), pp. 424-427.

Alexander, D. J., Manvell, R. J., Kemp, P. A., Parsons, G., Collins, M. S., Brockman, S., Russell, P. H. and Lister, S. A. (1987) "Use of monoclonal antibodies in the characterisation of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory.," *Avian Pathol* (16:4), pp. 553-565.

Alexander, D. J., Parsons, G. and Marshall, R. (1984a) "Infection of fowls with Newcastle disease virus by food contaminated with pigeon faeces.," *Vet Rec* (115:23), , pp. 601-602.

Alexander, D. J., Russell, P. H. and Collins, M. S. (1984b) "Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 1 characterisation of isolated viruses.," *Vet Rec* (114:18), , pp. 444-446.

Alexander, D. J., Russell, P. H., Parsons, G., Elzein, E. M., Ballouh, A., Cernik, K., Engstrom, B., Fevereiro, M., Fleury, H. J., Guittet, M., Kaleta, E. F., Kihm, U., Kusters, J., Lomniczi, B., Meister, J., Meulemans, G., Nerome, K., Petek, M., Pokomunski, S., Polten, B., Prip, M., Richter, R., Saghy, E., Samberg, Y., Spanoghe, L. and Tumova, B. (1985a)"Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons--an international collaborative study.," *Avian Pathol* (14:3), , pp. 365-376.

Alexander, D. J., Wilson, G. W., Russell, P. H., Lister, S. A. and Parsons, G. (1985b),

---

"Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984.," *Vet Rec* (117:17), pp. 429-434.

Alexander, D. J., Wilson, G. W., Thain, J. A. and Lister, S. A. (1984c), "Avian paramyxovirus type 1 infection of racing pigeons: 3 epizootiological considerations.," *Vet Rec* (115:9), pp. 213-216.

Alexander, D., Pattison, M. and McPherson, I. (1983) "Avian Paramyxoviruses of PMV-3 serotype in British turkeys," *Avian Pathology* (12), , pp. 469-428.

Alexander, D.J.and Hinshaw, V. and Collins, M. (1981), "Characteisation of viruses from doves representing a new serotype of avian paramyxoviruses," *Arch Virol* (68), pp. 265-269.

Bankowski, R., RE, C. and GT, C. (1960), "Isolation of an unidentified agent from the respiratory tract of chickens.," *Science* (132), pp. 292-293.

Barbezange, C. and Jestin, V. (2005), "Molecular study of the quasispecies evolution of a typical pigeon paramyxovirus type 1 after serial passages in pigeons by contact.," *Avian Pathol* (34:2), pp. 111-122.

Barbezange, C. and Jestin, (2003), V. "Monitoring of pigeon paramyxovirus type-1 in organs of pigeons naturally infected with Salmonella Typhimurium.," *Avian Pathol* (32:3), pp. 277-283.

Barbezange, C. and Jestin, V. (2002), "Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals.," *J Virol Methods* (106:2), pp. 197-207.

Beard, C. and Hanson, R. (1984), "Newcastle Disease", *Diseases of Poultry in Hofstad MS, Barnes HJ, C. B. Y. H. 8. e., ed., Ames IA : Iowa State University Press,* pp. 452-470.

Behr, K., Pöppel, M. and Reetz, G. (2008), "Geflügeljahrbuch 2008", Zentralverband der deutschen Geflügelwirtschaft e.V., pp. 196-204.

Bettmann, H. *Wildtauben*, (1973) BLV Verlagsgesellschaft München, Das Bergland Buch, Salzburg, Albert Müller Verlag Rüslikon Zürich,.

Biancifiori, F. and Fiorini, A. (1983), "An occurrence of Newcastle disease in pigeons: virological and serological studies on the isolates.," *Comparative Immunologie and Microbiologie of Infectious Diseases* (6), pp. 247-252.

Cloquhoun, M. (1951), *THE WOOD PIGEON IN BRITAIN*, Council, A. R. S. N. A. R., (eds.) His Majesty's Stationary Office,.

Collins, M. S., Alexander, D. J., Brockman, S., Kemp, P. A. and Manvell, R. J. (1989), "Evaluation of mouse monoclonal antibodies raised against an isolate of the variant avian paramyxovirus type 1 responsible for the current panzootic in pigeons.," *Arch Virol* (104:1-2), pp. 53-61.

Collins, M. S., Bashiruddin, J. B. and Alexander, D. J. (1993), "Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity.," *Arch Virol* (128:3-4), pp. 363-370.

Czeglédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O. and Lomniczi, B. (2006), "Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications.," *Virus Res* (120:1-2), pp. 36-48.

Deng, R., Wang, Z., Mirza, A. M. and Iorio, R. M. (1995), "Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike.," *Virology* (209:2), pp. 457-469.

DJV, Deutscher Jagdschutzverband, (2005) *DJV Handbuch*

Doyle, T. (1927), "A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter passing virus,"

---

*J. Comp. Path Therap.* (40), pp. 144-169.

EFSA Journal (2007), Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Animal Welfare regarding a request from the European Commission to review ND focussing on vaccination worldwide in order to determine its optimal use for disease control purposes, 477, 1-25.

Fauquet, C. and Mayo, M. (2005), "Virus Taxonomy: Eight Report of the Interational Comitee on the Taxonomie on Viruses", in C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. M. U. D. L. B., ed.,, Amsterdam, Boston, Heidelberg,London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisko, Signapore, Sydney ,Tokyo ELVESIER ACADEMIC PRESS, pp. 655-661.

Fischer, E. (1986) Diss Vet. Med., *Untersuchungen zur Pathologie der spontanen Paramyxovirus-1-Infektion der Taube*, Justus Liebig Univeristät zu Gießen,

Fischer, E., Frese, K., Meister, J. and E.F., K. (1986), *Zur Histopathologie der spontanen PMV-1-Infektion der Taube*, V. Tagung über Vogelkrankheiten in München, pp.141-149

Forster, K. et al., (2002) Antigene Differenzierung des Taubentyp Paramyxovirus 1 (pPMV-1) und Newcastle Disease Virus (NDV) nach Infektion bzw. Immunisierung von Tauben. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Fachgruppe Geflügelkrankheiten, XIII. Tagung über Vogelkrankheiten pp. 139-146.

Gallili, G. E. & Ben-Nathan, D. (1998), 'Newcastle disease vaccines.', *Biotechnol Adv* 16(2), 343-366.

Garten, W., Berk, W., Nagai, Y., Rott, R. and Klenk, H. D. (1980), "Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity.," *J Gen Virol* (50:1), pp. 135-147.

Gavrilenko, A. (2006), 'Entwicklung einer real-time multiplex multitube RT-PCR zur

---



Differentialdiagnostik der Klassischen Schweinepest', Diss. vet. med., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Globig, A (2007), „Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenza und aviären Paramyxoviren bei Wildvögeln in Deutschland“ Diss. vet. med., Tierärztliche Hochschule Hannover und FLI-Insel Riems

Grund, C. (2004), Habilitationsschrift, *Bedeutung von schwach virulenten Aviären Paramyxoviren bei Psittaziden*, Institut für Geflügelkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität, München,

Grüll, A. (1980) "Columbidae", in Handbuch der Vögel Mitteleuropas von Blotzheim, G., ed., Akademische Verlagsgesellschaft Wiesbaden, , pp. 13-41.

Hanson, R. "Newcastle Disease", in Diseases of Poultry Hofstad et al., ed., State University Press, Ames, Iowa State University Press, 1978, pp. 513-535.

Hanson, R. and Sinha, S. (1951), "Epizootic of Newcastle disease in pigeons and studies on transmission of the virus.," *Poultry Science* (31), pp. 404-408.

Harlow, E. and Lane, D. , und D. Lane, E. H. (1988), *Antibodies - a LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory,.

Hilbrich, P. (1972), "[Spontaneous Newcastle infection in a pigeon flock]," *Dtsch Tierärztl Wochenschr* (79:8), pp. 181-184.

Hlinak, A., Werner, O. and Ziedler, K. (1998) "[Occurrence of paramyxovirus 1 (PMV 1) infections in pigeons]," *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* (111:9), pp. 332-336.

Horikami, S. M., Curran, J., Kolakofsky, D. and Moyer, S. A. (1992), "Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro.," *J Virol* (66:8), pp. 4901-4908.

Häuselaiger, R., Sonnenburg, J., Kothlow, S., Kaspers, B., Staubach, C. and Grund, C. (2009), "Evaluation of an indirekt enzyme-linked immunosorbent assay to study the spezific humoral immune response of Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser* var. *domestica*) after vaccination against Newcastle Disease Virus," *Avian Pathology* (38), pp. 89-95.

Iorio, R. M., Field, G. M., Sauvron, J. M., Mirza, A. M., Deng, R., Mahon, P. J. and Langedijk, J. P. (2001), "Structural and functional relationship between the receptor recognition and neuraminidase activities of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein: receptor recognition is dependent on neuraminidase activity.," *J Virol* (75:4), pp. 1918-1927.

Iyer, S. "Paralysis in a pigeon due to Doyle`s (Ranikhet) disease virus (1939)," *Indian J. Vet. Sci. Anim. Husbandry* 1939 (9), pp. 379-382.

Jestin, V., Cherbonnel, M., Morin, M., Guittet, M. and Bennejean, G. (1989), "Characterization of French avian paramyxovirus type 1 (PMV 1) isolates with a Panel of monoclonal antibodies to the Ploufragan strain of Newcastle disease virus.," *Arch Virol* (105:3-4), pp. 189-198.

Kadden, O. , 2002, "Infektionen und Krankheiten durch Paramyxoviren", *in* Medizinische Mikrobiologie, Infektions und Seuchenlehre 7.ed Mayr, A., ed.,, Enke Verlag Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena, pp. 384-299.

Kaleta, E.F. (1999) "Newcastle Krankheit der Tauben", *in* Kompendium der Ziervogelkrankheiten 3.ed Junghanns, K., ed.,, Schlütersche Verlagsgesellschaft, pp. 295-296.

Kaleta, E.F. (1992a) "Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels", *in* Heider G, Monreal, G. 1. ed ed.,Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena, , pp. 628-638.

Kaleta, E.F (1999), "Kompendium der Ziervogelkrankheiten", *in* und M.E. Krautwald-Junghans, E. K., ed.,, Schülertsche Hannover, pp. 298-302.

---

Kaleta, E.F. and Baldauf, C. (1988) "Newcastle Disease in free-living and pet birds", in *Newcastle Disease* ed, A. D. 1., ed., Boston: Kluwerr Academic Publications, pp. 197-246.

Kaleta, E.F and Heffels, U. (1982), "Zum serologischen Nachweis des Paramyxovirus-1, 2 und-3 bei Tauben," *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* (89), pp. 31-32.

Kaleta, E. F. (1992b) "[Comparative pathogenicity tests of eight pigeon paramyxovirus 1 variant isolates in pigeons, turkeys and chickens]," *Dtsch Tierarztl Wochenschr* (99:12), , pp. 475-478.

Kaleta, E. F., Alexander, D. J. and Russell, P. H. (1985), "The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons ?," *Avian Pathol* (14:4), pp. 553-557.

Kaschula, V. (1952), "The domestic pigeon as possible carrier of Newcastle disease.," *Ondersteport J. Vet. Research* (25), pp. 25-27.

Kim, L. M., King, D. J., Curry, P. E., Suarez, D. L., Swayne, D. E., Stallknecht, D. E., Slemons, R. D., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Winker, K. and Afonso, C. L. (2007), "Phylogenetic diversity among low-virulence newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates.," *J Virol* (81:22), pp. 12641-12653.

Kim, L. M., King, D. J., Guzman, H., Tesh, R. B., da Rosa, A. P. A. T., Bueno, R., Dennett, J. A. and Afonso, C. L. (2008), "Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves.," *J Clin Microbiol* (46:10), pp. 3303-3310.

Klenk, H. D., Garten, W., Kohama, T., Huang, R. T. and Rott, R. "Activation of myxovirus glycoproteins by post-translational proteolysis. (1980), "*Biochem Soc Trans* (8:4), pp. 419-422.

---

Kommers, G., King, D., Seal, B., Carmichael, K. and Brown, C. "Pathogenesis of Six Pigeon-Origin Isolates of Newcastle Disease Virus for Domestic Chickens (2002)," *Vet Pathol* (39), pp. 353-362.

Kommers, G. D., King, D. J., Seal, B. S. and Brown, C. C. (2001), "Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens.," *Avian Dis* (45:4), pp. 906-921.

Kraneveld, F. (1926), "A Poultry disease in the Dutch East Indies," *Ned. Indisch B1 Diergenesk* (28), pp. 448-450.

Kraneveld, F. and Mansjoer, M. (1959), "Twe Mogelijkheden tot besmetting van Pluimveebedrijven met Pseudovogelpest," *Herma Zoa* (52), pp. 166-170.

Kösters, J., Schneeganß, D. and Korbel, R. (1992), "Erfahrungen mit der Impfung gegen Paramyxovirus-Infektion bei Tauben in der Bundesrepublik Deutschland," *Der Praktische Tierarzt* (9), pp. 861-869.

Küchler, B. (1997) *Untersuchungen zur Wirksamkeit, unter Berücksichtigung der Dauer der Immunität, von drei inaktivierten und einem Lebendadsorbat-Impfstoff gegen die Paramyxovirus-1-Infektion der Tauben.* Diss. Vet. Med.J. L. U zu Gießen,

Lamb, R. and Kolakofsky, D. (2001), "Paramyxoviridae, the viruses and their replikation", in *Fields Virology* Kniepe D.M., H. P., ed., Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1305-1340.

Lamb, R. and Parks, G. (2007) "Paramyxoviridae", in *Fields Virology* ed.5 David M. Nieve, P. M. H., ed., Philadelphia, Baltimore, New York, London, Boenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo Wolter Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins Health, pp. 1449-1496.

Lillehaug, A., Monceyron Jonassen, C., Bergsijo, B., Hofshagen, M., Tharaldsen, J., Nesse, L. and Handeland, K. (2005), "Screening of Feral Pigeon (*Columba livia*),

Mallard (*Anas platyrhynchos*) and Graylag Goose (*Anser anser*) Populations for *Campylobacter* spp., *Salmonella* Spp., Avian Influenza Virus and Avian Paramyxovirus," *Acta Vet Scand* (46(4)), pp. 193-202.

Lister, S. A., Alexander, D. J. and Hogg, R. A. (1986), "Evidence for the presence of avian paramyxovirus type 1 in feral pigeons in England and Wales.," *Vet Rec* (118:17), pp. 476-479.

Liu, H., Wang, Z., Son, C., Wang, Y., Yu, B., Zheng, D., Sun, C. and Wu, Y. (2006), "Characterization of pigeon-origin Newcastle disease virus isolated in China.," *Avian Dis* (50:4), pp. 636-640.

Lomniczi, B., Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi Pordany, A., E.F., K., O., W., G., M., Jorgensen, P., Mante, A., Gielkens, A., Capoa, I. and Damoser, J. (1998), "Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe caused by an old (VI) and novel genotype (VII)," *Arch Virol* (143), pp. 49-64.

Luttmann, W. and Mytrek, D. , W. Luttmann, K. Bratke, M. K. D. M., (2006). (eds.) *Der Experimentator Immunbiologie*, ELVESIER, Spektrum akademischer Verlag,

Mahon, P. J., Deng, R., Mirza, A. M. and Iorio, R. M. (1995) "Cooperative neuraminidase activity in a paramyxovirus.," *Virology* (213:1), pp. 241-244.

Maldonado, A., Arenas, A., Tarradas, M. C., Carranza, J., Luque, I., Miranda, A. and Perea, A. (1994), "Prevalence of antibodies to avian paramyxoviruses, 1, 2 and 3 in wild and domestic birds in southern Spain," *Avian Pathologie* (23), pp. 145-152.

Mayo, M. (2002) "Virus Taxonomy- Huston 2002," *Arch Virol* (147/5),

Mebatsion, T., Versteegen, S., Vaan, L. T. D., Römer-Oberdörfer, A. and Schrier, C. C. (2001), "A recombinant newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos." *J Virol* (75:1), pp. 420-428.

---

Meulemans, G., Berg, T. v. d., Decaesstecker, M. and Boschmans, M. (2002), "Evolution of Pigeon Newcastle disease virus strains," *Avian Pathology* (31), pp. 515-519.

Miller, J. and Levinson, S. (1996), "Immunoassay", in Diamandis, E. and Christopoulos, T., ed. Academic Press, pp. 165-190.

Modrow, S., Falke, D. and Tryen, U. S. (2003). "Molekulare Virologie" Modrow, D. Falke, U. T. e. 2., (eds.) *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg . Berlin,

Mohammed, M. A., Sokkar, S. M. and Tantawi, H. H. (1978), "Contagious paralysis of pigeons.," *Avian Pathol* (7:4), pp. 637-643.

Nagai, Y., Klenk, H. D. and Rott, R. (1976) "Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus.," *Virology* (72:2), , pp. 494-508.

Nerome, K., Nakayama, M., Ishida, M. and Fukumi, H. (1978), "Isolation of a new avian paramyxovirus from budgerigar (*Melopsittacus undulatus*).," *J Gen Virol* (38:2), pp. 293-301.

Ogasawara, T., Gotoh, B., Suzuki, H., Asaka, J., Shimokata, K., Rott, R. and Nagai, Y. (1992), "Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo.," *EMBO J* (11:2), pp. 467-472.

Office International des Epizooties (2008), O.I.E. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, O.I.E., chapter 2.3.14 Newcastle Diseases".

de Oliveira Torres Corrasco, A., Seki, M., de Freitas Raso, T., Paulillo, A. and Pinto, A. (2007),"Experimental Infection of Newcastle disease virus in Pigeon (*Columba livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding," *Veterinary Microbiology* 129 (1-2) pp. 69-96

---

Pearson, J. E., Senne, D. A., Alexander, D. J., Taylor, W. D., Peterson, L. A. and Russell, P. H. (1987), "Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons.," *Avian Dis* (31:1), pp. 105-111.

Peeters, B. P., de Leeuw, O. S., Koch, G. and Gielkens, A. L. (1999), "Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence.," *J Virol* (73:6), pp. 5001-5009.

Placidi, L. and Santucci, J. (1954), "SUR LA RECEPTIVE DE CERTAINES ESPECES AU VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE," *Ann. Inst. Pasteur* (84), pp. 583-594.

Reeve, P., Alexander, D. J., Pope, G. and Poste, G. (1971), "Studies on the cytopathic effects of Newcastle disease virus: metabolic requirements.," *J Gen Virol* (11:1), pp. 25-34.

Richter, R., Kösters, J. and Krämer, K. (1983), "Zur Paramyxovirusinfektion bei Tauben," *Der praktische Tierarzt* (64), pp. 915-917.

Ritchie, B. (1995). *Avian Viruses (Function and Control)*, Wringers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida,

Rott, R. (1979), "Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxovirus. A Brief review." *Arch Virol* (59:4), pp. 285-298.

Rott, R. and Klenk, H. (1988), "Newcastle Disease", in Alexander, D., ed., Boston: Kluwer Academic Publications, pp. 98-112.

Russel, P. and Alexander, D. (1983), "Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies.," *Arch Virol* (75), pp. 343-253.

Römer-Oberdörfer, A., Werner, O., Veits, J., Mebatsion, T. and Mettenleiter, T. C. (2003), "Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F

protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity.," *J Gen Virol* (84:Pt 11), pp. 3121-3129.

Samson, A., Levesly, I. and P.H., R. (1991), "The 36K polypeptide synthesized in Newcastle disease virus-infected cells possesses properties predicted for the hypothesized `v`protein," *J. Gen. Virol.* (72), pp. 1709-1713.

Scheid, A. (1987), "Animal virus structure", *in* Nermut, S., ed.,, *Elvesier Science* : New York, Amsterdam, London, Tokyo, pp. 233-252.

Scherner, E. (1980), "Columba palumbus- Ringeltaube", *in* Handbuch der Vögel Mitteleuropas von Blotzheim, G., ed.,, *Akademische Verlagsgesellschaft Wiesbaden*, pp. 64-97.

Schmellekamp, Anja (2005) „Untersuchungen zur Wirksamkeit einer homologen Ölemulsionsvakzine gegen die Paramyxovirose der Tauben basierend auf einem schwach virulenten Taubenstamm (P201) Diss. Vet. Med. LMU München

Schusser G., Lechner C., L. G. W. j. V. L. (1984), "Paramyxovirus-1-Infektion bei Tauben in Österreich.," *Wien.Tierärztl.Mschr.* (71), pp. 353-365.

Seal, B. (2004), "Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogentic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences," *Funct Integr Genomics* (4 (4)), pp. 246-257.

Seal, B., D.J., K. and H.S., S. (2000), "The avian reponse to Newcastle disease virus," *Developmental and Comparative Immunology* (24), pp. 257-268.

Sergel, T., McGinnes, L. W., Peeples, M. E. and Morrison, T. G. (1993), "The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation.," *Virology* (193:2), pp. 717-726.



Shortridge, K. F., Alexander, D. J. and Collins, M. S. (1980), "Isolation and properties of viruses from poultry in Hong Kong which represent a new (sixth) distinct group of avian paramyxoviruses.," *J Gen Virol* (49:2), pp. 255-262.

Stewart, G. H. (1971), "Naturally occurring clinical Newcastle Disease in the racing pigeon (*Columba livia*).," *Vet Rec* (89:8), pp. 225-226.

Stewart, M., Vipond, I., N.S., M. and Emmerson, P (1993), "RNA Editing in Newcastle disease virus," *J. Gen. Virol.* (74), pp. 2539-2547.

Tantawi, H., Al Falluji, M. and Al Sheikhly, F. (1979), "Viral encaphalomyelitis of pigeons: Identification and characterisation of the virus," *Avian diseases* (23-793), pp. 785.

Terregino, C., Calotti, G., Grossele, B., Bertoli, E., Tisato, E. and Capua, I. (2003), "Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy," *Avian Pathology* (32), pp. 63-68.

Tumvoa, B., Robinson, J. and Easterday, B. (1979), "A hithero unreported paramyxovirus of turkeys," *Res. vet. Science* (27), pp. 135-140.

Warrlich, A. (1988), *Untersuchungen zur experimentellen Paramyxovirus-1-Infektion der Brieftaube*, Dis. Vet. Med. J. L. U. zu Gießen

Werner, O., Römer-Oberdörfer, A., Köllner, B., Manvell, R. J. and Alexander, D. J. (1996) "Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to.," *Avian Pathol* (28:1), 1999, pp. 79-88.

Yang, C., Shieh, H., Lin, Y. and Chang, P. (1999), "Newcastle disease virus isolatet from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to virus (genotype VII) from recent outbreaks in western Europe," *Avian Dis* (43), pp. 125-130.

Yussof, K. and Tan, W. (2001), "Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities," *Avian Pathology* (30), pp. 439 - 455.

"Office International des Epizooties (O.I.E.) World Animal Health Information Database (WAHID) Interface <http://www.oie.int/wahid-prod.php?page=home>".

92/66/EEG Council Directive of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease, Official Journal 260, 5.9.1992, p 1."

Lancaster J.E., (1975) Newcastle disease: A review 1926-1964, Monograph No 3. Ottawa, Canadian Department of Agriculture, p 41".

Terrestrial Animal Health Code, ed 17, 2008 Volume 2, Chapter 10.13 Newcastle Disease pp 463-473, World Organisation for Animal Health".

Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpest-Verordnung) vom 18. Oktober 2007 (BGBl. IS. 2348)"

Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine (Schweine-Salmonellen-Verordnung) 13 März 2007 BGBl. I, pp. 322-327".

Verordnung über Sera, Impfstoffe und Antigene nach dem Tierseuchengesetz (TierimpfstoffVO) vom 24. Oktober 2006 (BGBl. I S. 49)

Wäckerlin, R. (2009) „Untersuchungen zu Infektionsverlauf und Ausbildung einer protektiven Immunität im Haushuhn (*Gallus gallus*) nach *in ovo* Infektion mit einem apathogenen aviären Paramyxovirusisolat vom Serotyp 1“ Dis. Vet. Med. LMU München

Warford, A.L. „Quality control in clinical virology“ in: Clinical virology manual. Eds Specter, S. Lancz G. New York, Amsterdam, London Tokyp: Elsevier 1992:3-18

Wise, M. G.; Suarez, D. L.; Seal, B. S.; Pedersen, J. C.; Senne, D. A.; King, D. J.; Kapczynski, D. R. & Spackman, E. (2004), 'Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples.', *J Clin Microbiol* **42**(1), 329-338.

## 9. ANHANG

### 9.1. TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1:** Prototypen der Paramyxovirusserotypen 1 – 9
- Tab. 2:** Einteilung von Aviären Paramyxoviren auf Grund Ihrer Virulenz
- Tab. 3:** Charakterisierung von APMV-1 Isolaten aus Tauben
- Tab. 4:** Nachweisdauer von APMV-1 mittels RT-PCR in verschiedenen Organen
- Tab. 5:** Temperaturprofil der RRT-PCR Reaktion
- Tab. 6:** Temperaturprofil der RRT-PCR auf dem NP-Proteingen
- Tab. 7:** Beschreibung der Ringeltaubenstichprobe
- Tab. 8:** Aktivität der Ringeltaubenserem im Hämagglutinationshemmungstest
- Tab. 9:** Reaktionen der APMV Antiseren 1-9 und den Proteinen von APMV 1 im Westernblot
- Tab. 10:** Reaktionsmuster von im Westernblot APMV-1 positiv bewerteter Ringeltaubenserem
- Tab. 11:** Reaktionsmuster von im Westernblot APMV-1 negativ bewerteter Ringeltaubenserem
- Tab. 12:** Reaktionsmuster von im Westernblot APMV-1 nicht eindeutig zuzuordnende Ringeltaubenserem
- Tab. 13:** Testgenauigkeit des ELISA bei unterschiedlichen Ausschlussgrenzen
- Tab. 14:** Vergleichende Titrations APMV positiver Ringeltaubenserem im Westernblot und ELISA
- Tab. 15:** Kreuzreaktionen zwischen Hyperimmunserem und Antigenen verschiedener APMV-Serotypen
- Tab. 16:** Reaktionen WB positiver Taubenserem im HAH mit anderen APMV Antigenen als APMV-1
- Tab. 17:** Mini- und maximale Jahresverteilung der positiven Ergebnisse im WB
- Tab. 18:** Jahresverteilung der positiven Ergebnisse im ELISA und wahre Prävalenz

## 9.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1:** Taxonomische Stellung aviärer Paramyxoviren
- Abb. 2:** Schematische Darstellung eines aviären Paramyxovirus und Charakterisierung der einzelnen Virusbestandteile nach ihrem Molekulargewicht und Ihrer Aminosäureanzahl
- Abb. 3:** Anstieg der Jagdstrecke von Ringeltauben in NRW von 1987–2005
- Abb. 4:** Einordnung der in Deutschland vorkommenden Subspezies innerhalb der Taubenvögel (Columbiformes)
- Abb. 5:** Geografische Einordnung der Jagdgebiete
- Abb. 6:** Gefieder von Jung und Alttaube im Vergleich.
- Abb. 7:** Darstellung einer ROC-Analyse
- Abb. 8:** Darstellung einer „area under the curve“ in der ROC Analyse
- Abb. 9:** ELISA-Reaktivität in Abhängigkeit von der Serumkonzentration
- Abb. 10:** ELISA-Reaktivität bei definiert APMV-negativen Taubenseren
- Abb. 11:** ELISA-Reaktivität der Ringeltaubenseren
- Abb. 12:** Darstellung der Proteine von APMV-1 und unbeimpfter Amnioallantiosflüssigkeit im Coomassie gefärbten Gel
- Abb. 13:** Darstellung der APMV-1 Proteine im Westernblot
- Abb. 14:** Titration des APMV-1 Antigens
- Abb. 15:** Kreuzreaktionen zwischen APMV-Hyperimmunseren und APMV-1
- Abb. 16:** Kreuzreaktionen von APMV-Hyperimmunseren mit Protein einer H5N1 infizierten Amnioallantiosflüssigkeit
- Abb. 17:** Verdünnungsstufen eines PPMV-1 positiven Taubenserums
- Abb. 18:** Reaktionsmuster von als positiv bewerteten Taubenseren
- Abb. 19:** Reaktion von APMV-1 positiven und negativen Taubenseren mit APMV-1 im Westernblot
- Abb. 20:** Ergebnisse des ELISA und des Westernblot im Vergeich
- Abb. 21:** Verteilung der S/P im ELISA von über den Westernblot definierten Seren
- Abb. 22:** Ermittlung der besten Ausschlussgrenze (Cut off) für die Bewertung des ELISA mittels ROC-Analyse.

- Abb. 23:** Verteilung der S/P-Werte der WB negativen, positiven und fraglichen Seren.
- Abb. 24:** Verdünnungsstufen von positiven Ringeltaubenseren
- Abb. 25:** SP-Werte im Verlauf der Verdünnung von positiven Ringeltaubenseren
- Abb. 26:** Vergleich der Titerstufen des HAH mit den Ergebnissen des Westernblot

### 9.3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
°C	Temperatur in Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AF	Allantoisflüssigkeit
APMV	aviäres Paramyxovirus
APMV-1	aviäres Paramyxovirus vom Serotyp 1
AUC	Area under the Curve
Aqua bidest.	2-fach destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
cT	cycle Threshhold
DNA	Deoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzymverstärkter Immunassay)
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
EEC	European Economic Community
FAM	6-Carboxyfluorescein
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Gramm
ICPI	intracerebraler Pathogenitätsindex
Ig	Immunglobulin

ha	Hektar
HEX	6-carboxy-hexachlorofluorescein
l	Liter
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NDV	Newcastle Disease Virus
O.I.E.	Organisation Internationale des Épizooties
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pmol	Pico-Mol
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
r/s	rounds per second
RT-PCR	reverse transcription PCR
RRT-PCR	real time RT-PCR
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-carboxy-tetramethylrhodamine
TBE	Tris Base EDTA
TE	Tris EDTA
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
W	Watt
WB	Western Blot

Aminosäure- und Nukleotidbezeichnungen wurden nach den Richtlinien der International Union of Biochemistry (IUB) abgekürzt

## 10. LEBENSLAUF

<b>Name</b>	Eva Friederike Huthmann
<b>Geburtsdatum</b>	27.06.1979
<b>Geburtsort</b>	Düsseldorf
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Eltern</b>	Gernot Huthmann, Rechtsanwalt Angelika Huthmann, Lehrerin
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Schulbildung</b>	1985-1989 Pastor Jakobs Grundschule, Meerbusch 1989-1998 Städt. Meerbusch Gymnasium, Meerbusch
<b>Hochschulausbildung</b>	1999-2001 Studium an der veterinärmedizinischen Universität Budapest 2001-2005 Studium der Tiermedizin an Justus-Liebig- Universität Gießen
<b>Approbation</b>	März 2005
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	Mai – Dezember 2005 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Humananatomie Giessen Seit Januar 2005 praktische Tierärztin
<b>Dissertation</b>	Seit 2007 Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems





## 11. DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Ch. Grund für die Überlassung des Themas, für seine immer zur Verfügung stehende Unterstützung und Geduld bei der Erstellung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Den Doktoranden, Doktorandinnen und Post Doc Wissenschaftlern des Friedrich Loeffler Instituts der Insel Riems, insbesondere Dr. Inge Müller, Dr. Regula Wäckerlin, Rafaela Häuslaigner Dr. Miriam Rudolf, Tobias Letzel und Dr. Alexander Postel danke ich für das exzellente Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen anregenden Unterhaltungen. Den technischen Assistentinnen Cornelia Illing und Jenny Hagemann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihr Engagement und ihre gute Laune.

Ich danke den Jägern, die bei der Probenbeschaffung mitgewirkt haben, insbesondere Jörg von Dylen.

Ein Dank geht an Dr. Ebermann für seine Unterstützung und sein Verständnis während der Fertigstellung der Dissertation.

Für ihre Freundschaft und die moralische Unterstützung danke ich Sascha Romanowski, Mareike Arts, Sabine Scheich, Ilona Brauer und Tina Birken.

Sascha – für ALLES

Meinen Brüdern Robert und Peter danke ich für die Gewissheit dass sie da sind, wenn es wirklich nötig ist.

Meinen Eltern, insbesondere meiner Mutter kann ich nicht genug für ihr Liebe, ihre Unterstützung und ihren Rückhalt während des Studiums, der Fertigstellung dieser Arbeit und jeder anderen Lebenslage danken.