

**Herstellung und Charakterisierung von  
Taubenimmunglobulin Y-spezifischem Hyperimmunserum  
und Einsatz in der Pacheco-Serodiagnostik**

**Katja von Schlippenbach**



**Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Korbel**

**Herstellung und Charakterisierung von  
Taubenimmunglobulin Y-spezifischem Hyperimmunserum  
und Einsatz in der Pacheco-Serodiagnostik**

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

**von  
Katja von Schlippenbach**

**München 2004**

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

Dekan: Univ.- Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.- Prof. Dr. R. T. Korbel  
Korreferentin: Univ.- Prof. Dr. K. Hartmann

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

<b>INHALTSVERZEICHNIS:</b>	<b>Seite</b>
1 EINLEITUNG	6
2 LITERATURÜBERSICHT	8
2.1 Die Pachecosche Papageienkrankheit	8
2.1.1 Ätiologie	8
2.1.2 Epidemiologie	12
2.1.3 Pathogenese	14
2.1.4 Klinische Verlaufsformen und Symptomatik	15
2.1.5 Pathologie und Histologie	16
2.1.6 Diagnose	17
2.1.7 Therapie	19
2.1.8 Immunprophylaxe	20
2.2 Aviäre Immunglobuline	21
2.3 Anwendung des ELISA in der Serodiagnostik aviärer Virusinfektionen	23
2.4 Kreuzreaktivitäten bei polyklonalen Hyperimmunseren	24
3 MATERIAL und METHODEN	26
3.1 SDS-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE )	26
3.2 Western-Blot	29
3.3 Virusanzucht und –aufreinigung	30
3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung des aufgereinigten PsHV und Proteinassay	31
3.5 Auswahl und Einteilung der Psittazidenserum für ELISA und Western Blot	32
3.6 Pacheco-ELISA	33
3.7 PsHV-Western Blot	34
4 ERGEBNISSE	35
4.1 Kreuzreaktivität des Hyperimmunserums im SDS-PAGE und Western Blot	35
4.1.1 Reaktivität mit Tauben-IgY	35
4.1.2 Kreuzreaktivität der IgY-Serumkomponenten der Klasse Aves	38
4.1.3 Unterschiede innerhalb der einzelnen Spezies	41
4.2 Qualitative und quantitative Untersuchung	

der gradientengereinigten Virussuspension	47
4.3 Nachweis PsHV-spezifischer Antikörper im ELISA und Western Blot	49
4.3.1 Festlegung geeigneter Antigen- und Serumkonzentrationen	49
4.3.2 Etablierung des Western Blot als Methode zur Überprüfung der ELISA-Ergebnisse	52
4.3.3 Bandenspektrum der virusspezifischen Proteine und Molekulargewicht der hauptimmunogenen Banden	54
4.3.4 Aufgliederung der ELISA-Ergebnisse nach Stärke der Farbreaktion (Extinktion)	57
4.3.5 Auswertung bezüglich Seroprävalenz	59
4.3.6 Speziesdifferenzierung bezüglich Seroprävalenz	62
5 DISKUSSION	65
5.1 Kreuzreaktivität des Hyperimmunserums im SDS-PAGE und Western Blot	65
5.2 Abweichungen der Untersuchungsergebnisse in Abhängigkeit vom jeweiligen Testverfahren	66
5.3 Seroprävalenz von PsHV-Antikörpern bei den untersuchten Populationen	67
5.4 Speziespezifische Unterschiede bezüglich der Seroprävalenz	68
5.5 Bandenspektrum der viralen Proteine von PsHV	68
5.6 Einsatzmöglichkeiten und Grenzen der vorgestellten Verfahren in der PsHV-Diagnostik	69
5.7 Anwendung der vorgestellten Immunoassays zur Bestandssanierung	70
6 ZUSAMMENFASSUNG	71
7 SUMMARY	72
8 LITERATURVERZEICHNIS	72
9 DANKSAGUNG	80
10 LEBENS LAUF	81

## ABKÜRZUNGEN

C-Regionen	Konstante Regionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz
ELISA	Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay
Fab-Fragment	Fragment-antigen-binding
Fc	Fragment crystallizable
HEF	Hühnerembryofibroblasten
H-Ketten	Schwere (heavy) Ketten
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y
ILT	Infektiöse Laryngotracheitis
L-Ketten	Leichte (light) Ketten
OPD	o-Phenyldiamindihydrochlorid
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PsHV	Psittaziden-Herpesvirus
PsHV-1	Psittaziden-Herpesvirus Typ 1
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Electrophoresis
TEMED	Tetramethylethyldiamin
(V-) Bereich	Variabler Bereich

## 1 EINLEITUNG

Herpesviren sind ubiquitär im Tierreich verbreitet. Sowohl bei warm- als auch bei kaltblütigen Wirbeltieren sind Herpesviren eine häufige Ursache für Erkrankungen. Bisher wurden etwa 90 verschiedene Herpesviren isoliert, die bei Säugetieren, Vögeln, Reptilien oder Amphibien zu klinischen Erkrankungen bzw. latenten Infektionen führen.

Bei Vögeln wurden bisher 19 verschiedene Herpesviren gefunden, die zum Teil schwere Krankheiten verursachen und vor allem beim Wirtschaftsgeflügel zu erheblichen Verlusten führen. Beispiele sind die Infektiöse Laryngotracheitis, die durch das Gallid Herpesvirus 1 verursacht wird oder die Mareksche Erkrankung, bei der das Gallid Herpesvirus 2 der Auslöser ist. Bei Psittaziden beschriebene Herpesviren (PsHV) sind verantwortlich für die Pachecosche Krankheit. Diese weltweit auftretende Erkrankung führt nach perakut bis akutem Verlauf zu seuchenartigen Todesfällen. Insbesondere wird von Ausbrüchen in Quarantänestationen bzw. in Beständen nach Zukauf eines neuen Tieres berichtet. Daher wird eine Übertragung durch latent infizierte Tiere vermutet, bei denen es durch den Stress der Neueinstellung zur Reaktivierung der Virusausscheidung kommt.

Um bei Neuzugängen eine Gefährdung eines Bestandes durch latente PsHV-Träger zu vermeiden, empfiehlt sich eine geeignete Voruntersuchung. Dazu eignet sich eine serologische Untersuchung, die herkömmlich auf einem Virusneutralisationstest basiert. Neuere Untersuchungen belegen serologische Unterschiede verschiedener PsHV-Stämme mit nur bedingter Kreuzreaktivität im Neutralisationstest. Ziel der vorgelegten Arbeit war daher die Etablierung eines leistungsfähigen serologisch-immunologischen Nachweisverfahrens für Psittazidenherpes, die auch gruppenspezifische Antigene erfasst und Reihenuntersuchungen erlaubt. Grundvoraussetzung für immunvermittelte serologische Testsysteme im Papageienbereich stellen geeignete sekundäre Antikörper dar. Nur bei Reaktivität eines entsprechenden speziesspezifischen Antiserums mit einer Vielzahl von Psittaziden-Antikörpern ist die Etablierung eines ELISA für die Praxis sinnvoll. In der vorgelegten Arbeit sollte daher primär die Kreuzreaktivität eines gegen



Taubenimmunglobulin Y gerichtetes Hyperimmunserum mit Immunglobulinen von Papageienarten charakterisiert werden. Eine funktionelle Prüfung war im Bereich eines PsHV-ELISA und PsHV-Western Blot angestrebt. Eingesetzt in Bestandsuntersuchungen sollte sowohl die Leistungsfähigkeit der zu etablierenden Teste untersucht sowie erstmals Daten über die PsHV-Seroprävalenz erarbeitet werden. Diese dienen zu einer fundierten Abschätzung der Gefährdung durch Neuzugänge.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Die Pachecosche Papageienkrankheit

#### 2.1.1 Ätiologie

##### 2.1.1.1 Herpesvirusnachweis

Im Jahre 1930 beschrieben Pacheco und Bier eine verlustreiche Erkrankung bei Psittaziden, die starke Ähnlichkeit mit der Psittakose aufwies und 1933 von Findlay die Bezeichnung „Pacheco's Parrot Disease“ erhielt. Der Beweis, dass die Erkrankung durch ein Virus verursacht wird, gelang Rivers und Schwentker im Jahre 1932 (EHR SAM et al. 1978). Erst 1976 wurden bei verendeten Vögeln eines Ausbruchs in einer Voliere in Florida durch virologische, elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen Herpesviren mit ikosaedrischem Nukleokapsid nachgewiesen (SIMPSON und HANLEY 1976).

Der Herpesvirusnachweis wurde in zahlreichen anderen Studien bestätigt: In einer Studie zur Charakterisierung verschiedener Viren bei Psittaziden wiesen HIRAI et al. (1978) aus einem Bestand Rosellas mit hoher Mortalität typische Charakteristika von Herpesviren nach. Die Isolate zeigten in Hühnerembryofibroblasten- und Hühnernierenzellkulturen einen zytopathischen Effekt mit Ausbildung intranukleärer Einschlusskörperchen. Elektronenmikroskopisch waren Herpesviren nachweisbar, die mit Pacheco-Antiserum im Virusneutralisationstest neutralisiert wurden, aber keine Kreuzreaktivität mit Antiseren gegen Infektiöse Laryngotracheitis, Mareksche Krankheit oder Putenherpes zeigten. Bei der Untersuchung eines Ausbruchs in der Schweiz stellten EHR SAM et al. (1978) erstmals die Hypothese einer latenten Infektion mit stressbedingter Reaktivierung und Ausscheidung auf und zeigten aus dem Auftreten intranukleärer Einschlusskörperchen, dem charakteristischen aus herdförmig gelegenen rundlichen Zellen bestehenden zytopathischen Effekt in der Hühnerembryofibroblasten-Zellkultur und dem elektronenmikroskopischen Befund, dass es sich bei der Pachecoschen Papageienkrankheit um eine Herpesviruserkrankung mit typischen pathohistologischen und virologischen Befunden handelt.

#### 2.1.1.2 Charakteristika aviärer Herpesviren

Wie alle Herpesviren sind Psittazidenherpesviren (PsHV) behüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von 120 – 200 nm mit typischer Morphologie (HIRAI et al. 1978): Das Core im Inneren enthält die lineare, doppelsträngige, in ein spindelförmiges Proteingerüst eingebaute DNA. Es wird von einem Nucleocapsid in Form eines Ikosaeders umgeben. Der Durchmesser dieses Nucleocapsids beträgt 100-110 nm. Zwischen dem Nucleocapsid und der äußeren Hülle liegt das Tegument, das keine spezifische Struktur aufweist. Die Virushülle (Envelope) besteht aus zwei Schichten. Sie enthält Lipide und auf der Oberfläche sogenannte Projektionen, die aus virusspezifischen Glykoproteinen bestehen (ROIZMANN 1990; ROIZMANN und BAINES 1991; LÖFFLER/PETRIDES 1990).

#### 2.1.1.3 Einordnung nach pathohistologischen Kriterien

Bei Vögeln wurden bisher 19 verschiedene Herpesvirus-Isolate identifiziert (KALETA 1989). Bei einer Untergliederung der aviären Herpesviren nach pathohistologischen Befunden (neoplastisch/hämorrhagisch/nekrotisch) wird das Psittaziden-Herpesvirus wie z. B. auch Tauben-, Eulen-, Falken-, Wachtel- und Kranichherpesviren dem nekrotischen Typ zugeordnet (KALETA 1989).

#### 2.1.1.4 Serotypen

Alle frühen PsHV-Isolate schienen eine serologisch einheitliche Gruppe zu bilden. Seit 1988 wurde vermehrt das Vorkommen unterschiedlicher Serotypen und deren Bedeutung erforscht: Erste Hinweise auf die Existenz verschiedener Serotypen gab es 1988 bei einem Pacheco-Ausbruch mit hoher Mortalität in einem privaten Papageienbestand (KRAUTWALD et al. 1988). Dabei wurde ein Herpesvirus isoliert, das im Neutralisationstest keine Kreuzreaktivität mit den bisher bekannten Erregern der Pachecoschen Krankheit zeigte. Bezüglich der Krankheitsempfänglichkeit bestand kein Unterschied zwischen Papageien der neuen (Amazonen) und alten Welt (Graupapageien), während drei Sittiche kaum Krankheitsanzeichen zeigten. Bei einem Pacheco-Ausbruch in Italien in einem Bestand frisch importierter Psittaziden aus Guayana, die trotz Impfung mit einer Vakzine gegen PsHV 1 erkrankten, gelang 1996 erstmals die Isolierung des PsHV Serotyp 2 (MAGNINO et al. 1996). Im Kreuzneutralisationstest wiesen GRAVENDYCK et al. (1996) 5 verschiedene Serotypen (PsHV 1-5) nach. Am häufigsten werden Herpesviren des Serotyp 1

isoliert. Bei Psittaziden konnten neben den verschiedenen Serotypen von PsHV bei respiratorische Erkrankung bei Amazonen und verschiedenen australischen Sittichen noch ein weiteres  $\alpha$ -Herpesvirus isoliert werden, das eine Kreuzreaktivität mit dem Virus der Infektiösen Laryngotracheitis aufweist und in Anlehnung daran als Amazonen-Tracheitisvirus bezeichnet wird. Es verursacht keine Einschlusskörperchen in der Leber und weist keine Kreuzreaktivität mit dem Psittaziden-Herpesvirus auf (GERLACH et al. 2000).

#### 2.1.1.5 DNA-Analyse

Durch Teilsequenzierung der viralen DNA bewiesen TOMASZEWSKI et al. (2001), dass es sich beim Psittaziden-Herpesvirus um ein  $\alpha$ -Herpesvirus mit enger Verwandtschaft zum Gallid Herpesvirus 1 handelt. In aktuellen Studien zur PsHV-Typisierung erfolgte die Spaltung der viralen DNA mit Restriktions-Endonukleasen. Dabei waren bei der Analyse von 31 Virusstämmen von 15 verschiedenen Psittazidenspezies 12 unterschiedliche Restriktionsmuster erkennbar. Diese Analysen bestätigten die Resultate der konventionellen Serogruppierung, stellten aber unter den fünf etablierten serologischen Subtypen zusätzliche Unterschiede fest und bestätigten die Existenz antigenisch und genetisch unterschiedlicher PsHV-Stämme (SCHRÖDER-GRAVENDYCK et al. 2001).

Der Nachweis, dass es sich bei PsHV um eine genetisch heterogene Gruppe von Viren handelt, gelang TOMASZEWSKI et al. (2001) durch Entwicklung einer PsHV-spezifische PCR zum Nachweis der viralen DNA von PsHV in Gewebeproben und Zellkultur. Mithilfe von 5 Primer-Paaren gelang die Isolierung von 10 verschiedenen Varianten mit unterschiedlichen Amplifikationsmustern, wobei nur ein Primerpaar alle Varianten erfasste. Die häufigste genetische Variante (62.7 % aller untersuchten Proben) wurde von allen 5 Primer-Sets erfasst.

#### 2.1.1.6 Latenz

Ein Charakteristikum vieler Herpesviren ist ihre Fähigkeit zur latenten Infektion mit zum Teil lebenslanger Persistenz des Erregers. Latenz wird definiert als die Präsenz eines viralen Genoms ohne Produktion von infektiösem Virus. Dabei liegt bei Herpesviren die virale DNA als ringförmiges, geschlossenes Molekül extrachromosomal im Kernplasma der befallenen Zelle und wird bei der Zellteilung

durch die zelleigene DNA-Polymerase mitrepliziert (MODROW und FALKE 1997). Das Stadium der latenten Infektion umfasst 3 Phasen (WAGNER und BLOOM 1997). Bei der Etablierung dringt das Virus in die Zelle ein, die Expression der viralen Gene wird auf ein Minimum reduziert. Während der Aufrechterhaltung der latenten Infektion bildet das virale Genom in der betroffenen Zelle ein Reservoir für potentiell infektiöses Virus. Während dieser Phase werden keine viralen Proteine freigesetzt.

Die Phase der Latenz kann immer wieder mit Phasen subklinischer Infektion mit Freisetzung von infektiösem Virus abwechseln. Bei der Reaktivierung des Virus wird infektiöses Virus freigesetzt und die infizierte Zelle zerstört (ROIZMANN und BAINES 1991). Man nimmt an, dass die Reaktivierung durch Immunsuppression, beispielsweise durch ein Stressereignis, ausgelöst wird. Sie kann eine erneute Virusausscheidung oder klinische Manifestation bewirken.

Die Fähigkeit, persistierende Infektionen auszulösen und sich – auch in Gegenwart von Antikörpern – zu replizieren, gehört zu den besonderen Eigenschaften von Herpesviren und wurde bei vielen Vertretern aviärer Herpesviren nachgewiesen (SCHMIDT 1992). Man geht davon aus, dass auch bei PsHV latente Ausscheider vorkommen, die das Virus über einen langen Zeitraum intermittierend ausscheiden und in vielen Fällen die Infektionsquelle darstellen (GASKIN 1981, PANIGRAHY and GRUMBLES 1983, GOUGH and ALEXANDER 1993).

Die Existenz latent PsHV-infizierter Psittaziden wird in einigen Studien belegt: So wurden aus 70 Serumproben von klinisch gesunden Graupapageien und Amazonen aus Einzelhaltung in 24 Fällen Antikörper gegen PsHV im Serumneutralisationstest nachgewiesen (KRAUTWALD et al. 1988). Mittels einer Pacheco-spezifischen PCR untersuchten PHALEN et al. (2001) kombinierte Tupferproben aus Pharynx und Kloake und Blutproben von 61 Psittaziden verschiedener Spezies, die Kontakt zu PsHV-erkrankten Vögeln hatten oder einen Pacheco-Ausbruch überlebt hatten. Die Mehrheit der untersuchten Psittaziden waren über den Zeitraum eines Jahres konstant positiv, schieden also Virus aus. Alle Psittaziden, die eine klinische Pacheco-Erkrankung überstanden hatten, reagierten während des gesamten Beobachtungszeitraums in der PCR positiv. In derselben Studie erwiesen sich 0.54%

der von praktischen Tierärzten eingeschickten Proben als positiv in der PCR, wobei insbesondere importierte Amazonen häufig positiv getestet wurden.

Man geht davon aus, dass es analog zu anderen Herpesviruserkrankungen durch stressbedingte Immunsuppression zur Erkrankung nach Neuinfektion oder Reaktivierung einer latenten Infektion mit PsHV kommt (BIGGS 1982, PANIGRAHY and GRUMBLES 1983, GOUGH, ALEXANDER 1993, ESKENS et al. 1994, KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS 1999). So zeigen Studien zahlreicher Ausbrüche der Pachecoschen Papageienkrankheit, dass der Erkrankung meist ein Stressereignis vorausgeht, z. B. Fang und Quarantäne bei Importvögeln, Besitzerwechsel, Klinikaufenthalt, Eintritt der Sexualreife oder Brutbeginn. Häufig treten Erkrankungen bei frisch importierten Psittaziden (GASKIN et al. 1979, KALETA et al. 1980) oder nach Integration neuer Tiere in alteingesessene Bestände (MILLER et al. 1979, EHRSAM et al. 1978) auf. Es wurden auch Fälle dokumentiert, wo Erkrankungen in einem geschlossenen Bestand auftraten, ohne dass ein neuer Vogel eingegliedert worden war (PANIGRAHY und GRUMBLES 1983; CARTWRIGHT et al. 1985, ESKENS et al. 1994).

### **2.1.2 Epidemiologie**

Die Pachecosche Papageienkrankheit ist seit Jahrzehnten als ernstzunehmende Erkrankung der Psittaziden bekannt, die weltweit immer wieder hohe Verluste in Beständen verursacht. Die Dokumentation zahlreicher Pacheco-Ausbrüche in verschiedenen Erdteilen in den folgenden Jahren unterstreicht die weltweite Bedeutung dieser Erkrankung, die aufgrund der hohen Kontagiosität und Mortalität zum Teil zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten bei Händlern und Importstationen führt: So starben bei einem Ausbruch in Texas 1978 nach dem Eintreffen von Neuzukäufen aus einer Quarantänestation circa 200 Tiere. Histologische Untersuchungen ergaben deutliche Hinweise auf die Pachecosche Erkrankung und im Neutralisationstest wurden PsHV-spezifische Antikörper nachgewiesen (MILLER et al. 1979). Auch in Indonesien starben mehrere Kakadus bei einem Pacheco-Ausbruch in einer Quarantänestation (DHARMA und SUDANA 1982). In den folgenden Jahren wurden verschiedene Ausbrüche weltweit beschrieben, die

bezüglich klinischer Symptomatik, histologischer Befunde und Virusisolation weitgehend ähnliche Ergebnisse lieferten (GASKIN et al. 1979; CARTWRIGHT et al. 1985; GOUGH, ALEXANDER 1993; KALETA, MARSCHALL, HEFFELS, MIKAMI 1980; KALETA 1983). Bei 47 von 533 Psittaziden, die zwischen 1979 und 1982 an der Universität in Texas sezirt wurden, wiesen PANIGRAHY and GRUMBLES (1983) PsHV nach.

Man geht davon aus, dass alle Psittazidenspezies für PsHV-Infektionen empfänglich sind, wobei bei Sittichen oft milde bis subklinische Krankheitsverläufe beobachtet werden (EHRSAM et al. 1978; KRAUTWALD et al. 1988; STEINKE 1998), während bisherigen Untersuchungen zufolge Aras, Amazonen, Graupapageien und Kakadus häufig einen schweren bis letalen Verlauf zeigen (STEINKE 1998; KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS 1999). So verendeten beispielsweise bei einem akuten Pacheco-Ausbruch in einem Schweizer Psittazidenbestand nach Zukauf von Kakadus aus Importquarantäne während des Ausbruchs 18 von 23 Psittaziden, wohingegen Wellen- und Nymphensittiche trotz Kontakt nicht klinisch apparent erkrankten (EHRSAM et al. 1978). Auch in einem Zuchtbestand, in dem 29 von 45 Großpapageien starben, verendeten Amazonen binnen eines Tages, während Graupapageien, Aras und Kakadus 3-5 Tage überlebten und von den im Bestand lebenden Sitticharten (Blaustirn-, Braunohr-, Weißflügel-, Felsen-, Mönch-, Kanarienzügel- und Wellensittich) kein einziger starb (STEINKE 1998).

Die Verlaufsformen ohne Ausbildung charakteristischer Krankheitssymptome sind epidemiologisch besonders bedeutsam, da es Hinweise auf eine lang anhaltende, möglicherweise lebenslange Persistenz der Herpesviren im Organismus gibt (PHALEN et al. 2001), ohne dass die betroffenen Vögel klinisch apparent erkrankt sind. Insbesondere bei Reaktivierung einer latenten Infektion mit nachfolgender Virusausscheidung nach Stressereignissen könnten diese latent infizierten Vögel eine permanente Gefährdung für Kontakttiere darstellen (BIGGS 1982; PANIGRAHY und GRUMBLES 1983; GOUGH und ALEXANDER 1993; ESKENS et al. 1994).

Der Infektionsweg bei natürlichen PsHV-Infektionen ist noch nicht endgültig geklärt. Bei erkrankten Tieren konnte Virus aus Fäzes, Darm, Kloake und Rachen sowie Trachea, Lunge und Federfollikeln isoliert werden. Eine natürliche Infektion ist daher

durch perorale Aufnahme oder Inhalation (Aerosole von Körperausscheidungen, Federstaub) denkbar (ESKENS 1994, RAMIS et al. 1996, GRAVENDYCK et al. 1998). Dies konnte experimentell nachvollzogen werden (GASKIN et al. 1979, YORK und YORK 1983). Studien von Ausbrüchen zeigten, dass unter natürlichen Bedingungen die Übertragung hauptsächlich durch Kontakt oder Aufnahme von Kot erfolgt. So erkrankten bei einem Ausbruch in der Schweiz zuerst die Vögel in den benachbarten Käfigen, erst später im Verlauf des Ausbruchs wurde ein Mittelgang übersprungen (EHRSAM et al. 1978). Untersuchungen mittels PsHV-spezifischer PCR zeigten, dass von Elterntieren aufgezogene Nachzucht PsHV-positiver Amazonen in der Regel ebenfalls PsHV-positiv getestet wurde, während im Brutschrank geschlüpfte Nachzucht PsHV-negativ war. Dies spricht für eine rein horizontale Übertragung des Virus (PHALEN et al. 2001).

### **2.1.3 Pathogenese**

Die Pathogenese der Pachecoschen Papageienkrankheit ist noch nicht vollständig erforscht. Bei Infektionsversuchen gelang bei peroraler Virusaufnahme der Virusnachweis etwa 3 Tage nach experimenteller Infektion zuerst in der Kloakenschleimhaut sowie aus Leber und Milz (RAMIS et al. 1996). Wenige Tage später, wahrscheinlich nach einer virämischen Phase, ist infektiöses Virus in zahlreichen Organen nachweisbar, vor allem in Leber und Milz, häufig aber auch aus Haut und Federpulpa, Muskulatur, Respirationstrakt, Blutkreislaufsystem, Nervensystem, Schilddrüse, Nebennieren, Urogenital- und Verdauungstrakt (ESKENS et al. 1994, GRAVENDYCK et al. 1998). Dabei ist eine hohe Affinität zu epithelialen und lymphoiden Zellen erkennbar, die auch für andere aviäre Herpesviren charakteristisch ist, wie z.B. Entenpest, Eulen- und Falkenherpes (RAMIS et al. 1996).

Bei peroraler Infektion gelang der Nachweis von infektiösem Virus erst einige Tage später als bei intramuskulärer Inokulation (RAMIS et al. 1996), was dadurch zu erklären ist, dass das Virus bei peroraler Infektion erst die Darmschranke überwinden und ins Blutssystem gelangen muss.



In Leber, Milz, Nieren und Knochenmark entstehen herdförmige Nekrosen. Durch die Schädigung der Zellen der Intima der Blutgefäße durch die Virusvermehrung kommt es zu Zirkulationsstörungen und Blutungen (ESKENS et al. 1994, GRAVENDYCK et al. 1998). Als Todesursache ist letztlich die Funktionsstörung der parenchymatösen Organe sowie des ZNS und Zirkulationssystems anzunehmen.

#### **2.1.4 Klinische Verlaufsformen und Symptomatik**

Es gibt verschiedene Verlaufsformen der Pachecoschen Krankheit. Die Krankheitssymptome sind aufgrund der Vielzahl betroffener Organe oft nur wenig spezifisch und lassen allenfalls eine Verdachtsdiagnose zu. Auch die unterschiedliche Krankheitsempfänglichkeit verschiedener Psittazidenspezies beeinflusst die Verlaufsform und Symptomatik der Erkrankung. Bei Vögeln in Stress-Situationen, wie zum Beispiel in Quarantänestationen, werden häufig perakute und akute Krankheitsverläufe mit hoher Mortalität beobachtet (MILLER et al. 1979, DHARMA und SUDANA 1982, SENNE et al. 1983). Bei perakuten Verlauf treten plötzliche Todesfälle auf, denen meist keine klinischen Symptome vorausgehen. Häufig werden insbesondere zu Beginn eines Ausbruchs eines oder mehrere Tiere plötzlich tot aufgefunden. So kommt es vor allem bei Amazonen immer wieder zu perakuten Krankheitsverläufen (STEINKE 1998).

Die akute Verlaufsform ist gekennzeichnet durch hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden und hohe Mortalität. Neben Anorexie und Lethargie treten häufig senfgelbe, zum Teil auch blutige Durchfälle und Polyurie auf (PANIGRAHY and GRUMBLES 1983; KRAUTWALD 1988; MUTLU, SCHNEEGANß, KORBEL 1991; ESKENS et al. 1994; KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS, 1999). Vor allem bei Aras, Amazonen, Graupapageien und Kakadus wird häufig eine schwerer bis letaler Verlauf beschrieben (EHRSAM et al. 1978; STEINKE 1998; KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS, 1999).

Es werden aber auch subklinische und latente PsHV-Infektionen dokumentiert. Insbesondere bei Sittichen werden oft milde bis subklinische Krankheitsverläufe beobachtet (EHRSAM et al. 1978, KRAUTWALD et al. 1988, STEINKE 1998).

Aufgrund der unterschiedlichen Symptome und Verlaufsformen wird angenommen, dass die einzelnen PsHV-Subtypen zum Teil unterschiedliche Organspezifität aufweisen. Je nach betroffenem Organspektrum werden immer wieder atypische Verläufe der Pachecoschen Papageienkrankheit beschrieben, bei denen respiratorische Symptome mit Dyspnoe und Nasenausfluss, zentralnervöse Symptomatik mit Lähmungen oder Krämpfen oder gastrointestinale Beschwerden mit Erbrechen und Regurgitation dominieren (PANIGRAHY and GRUMBLES 1983; KRAUTWALD 1988; MUTLU, SCHNEEGANß, KORBEL 1991; ESKENS et al. 1994; KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS, 1999).

## **2.1.5 Pathologie und Histologie**

### 2.1.5.1 Makroskopische Befunde

Makroskopische Veränderungen treten in erster Linie an Leber, Milz und Darm auf. Die häufigste Diagnose ist eine fettige Leberdegeneration und –schwellung mit herdförmigen Nekrosen und Blutungen (EHRSAM et al. 1978; PANIGRAHY und GRUMBLES 1983; MUTLU et al. 1991; ESKENS et al. 1994). Eine Vergrößerung der Milz und katarrhalische oder hämorrhagische Enteritis werden ebenfalls häufig beschrieben (PANIGRAHY und GRUMBLES 1983; MUTLU et al. 1991; ESKENS et al. 1994). Weitere Organveränderungen, die gelegentlich im Zusammenhang mit einer Pacheco-Erkrankung auftreten, sind Nierenschwellungen, Petechien und Hämorrhagien der Serosen sowie eine Drüsenmagendilatation (PANIGRAHY und GRUMBLES 1983; MUTLU et al. 1991; ESKENS et al. 1994).

So zeigten von 36 postmortal untersuchten Psittaziden aus einer Vogelhandlung, die an Pachecoscher Papageienkrankheit gestorben waren, etwa zwei Drittel der Tiere eine fettige Leberdegeneration und –schwellung. In etwas mehr als der Hälfte der Fälle fiel eine Milzvergrößerung auf. Bei etwa 50 % wurde eine katarrhalische oder katarrhalisch-hämorrhagische Enteritis festgestellt. Wenige Tiere (etwa ein Achtel) zeigten Nierenschwellung, Hämorrhagien und Petechien in den Leibeshöhlenserosen oder eine Drüsenmagendilatation (ESKENS et al. 1994).

### 2.1.5.2 Histologische Befunde

Bei einem Großteil der an PsHV verendeten Psittaziden sind diffuse Leberzellnekrosen und eosinophile intranukleäre Einschlusskörperchen in Hepatozyten und/oder Gallengangsepithelien nachweisbar. So wiesen von 36 postmortal untersuchten Psittaziden aus einer Vogelhandlung, die an Pachecoscher Papageienkrankheit gestorben waren, 22 Tiere (etwa zwei Drittel) eosinophile Kerneinschlusskörperchen in Hepatozyten und/oder Gallengangsepithelien auf (ESKENS et al. 1994).

Veränderungen in anderen Organen werden in unterschiedlicher Häufigkeit beschrieben. Intranukleäre Einschlüsse treten gelegentlich in Glomerulumzellen der Nieren, Bronchialepithel, Retikulumzellen der Milz, Kryptenepithelien des Dünndarms und Ösophagusepithel auf (EHRSAM et al. 1978; PANIGRAHY und GRUMBLES 1983; ESKENS et al. 1994). Hyperämien und Blutungen werden bei einem Teil der seziierten Tiere in der Lunge, subepikardial am Herz, Trachea, Nieren, Adventitia des Oesophagus und des Magen-Darm-Trakts sowie in Gehirn und Meningen gefunden (KRAUTWALD 1988, ESKENS et al. 1994). Gelegentlich treten auch herdförmige nichteitrig entzündliche Infiltrate in der Bursa fabricii, Luftsackwand und Lunge, in subepikardialem Bindegewebe, Trachealschleimhaut, Schilddrüse, Subkutis, Oesophagealschleimhaut sowie in Adventitia, Muskularis und Mukosa des Gastrointestinaltrakts und perivaskulär im Gehirn auf (ESKENS et al. 1994).

## 2.1.6 Diagnose

### 2.1.6.1 Diagnose post mortem

#### Pathologisch-anatomische Verdachtsdiagnose:

Post mortem kann aufgrund der charakteristischen pathologisch-anatomischen Veränderungen wie Leber- und Milzschwellung mit herdförmige Nekrosen und anhand der histologischen Befunde wie herdförmige Nekrosen und intranukleäre Einschlusskörperchen (Cowdry A) in Hepatozyten, Gallengangsepithelien, Milz, Pankreas und Darmepithel eine Verdachtsdiagnose gestellt werden (EHRSAM et al. 1978; PANIGRAHY und GRUMBLES 1983; MUTLU et al. 1991; ESKENS et al.

1994). Bei perakutem Verlauf fehlen charakteristische Organveränderungen häufig (ESKENS et al. 1994).

#### Virusnachweis und Serotypisierung:

Die Absicherung der pathologisch-anatomischen oder klinischen Verdachtsdiagnose erfolgt durch den Nachweis von PsHV aus Organen verendeter Vögel. Da die Tiere meist im Stadium der Virämie verenden, gelingt die Virusisolation aus zahlreichen Organen wie z. B. Leber, Milz, Darm, Blutgefäße, ZNS und Federkiele (ESKENS et al. 1994, GRAVENDYCK et al. 1998). Der Virusnachweis erfolgt mittels Immunfluoreszenz, Elektronenmikroskopie oder durch Anzucht auf Chorioallantoismembran mit anschließendem Nachweis des typischen zytopathischen Effekts in einer Hühnerembryofibroblasten-Zellkultur mit Bildung herdförmig gelegener rundlicher granulierter Zellen (KRAUTWALD et al. 1988) ab dem zweiten Tag nach der Infektion und nachfolgend deren Abrundung und Lösung aus dem Zellverband. Vereinzelt treten auch Synzytien mit 4-16 Kernen auf (ESKENS et al. 1994, GRAVENDYCK et al. 1998). Diese Zellveränderungen treten besonders häufig in Kulturen auf, die mit Herz- oder Lungenhomogenisaten inokuliert waren, während die Isolationsraten aus Leber und Milz deutlich geringer waren (ESKENS et al. 1994). Weitere für Herpesviren charakteristische Eigenschaften zur Abgrenzung von anderen Virusinfektionen sind auch bei PsHV die Chloroformempfindlichkeit und die Zerstörung der Infektiosität durch Jod-Desoxyuridinbehandlung (KRAUTWALD et al. 1988, ESKENS et al. 1994). Die Serotypisierung erfolgt mithilfe spezifischer Antikörper.

#### 2.1.6.2 Diagnose in vivo

##### Klinische Verdachtsdiagnose:

In vivo kann häufig nur eine Verdachtsdiagnose aufgrund der Anamnese (Stressereignis, Exposition zu Ausscheidern) und klinischen Symptomatik gestellt werden. Hinweise geben erhöhte Serum-Glutamatdehydrogenase- und Aspartat-Amino-Transferase-Konzentrationen und eine Leukopenie (KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS 1999). Im Stadium der Virämie ist der Virusnachweis aus Pharynx- und Kloakentupfern oder aus Blutkieselchen möglich (GRAVENDYCK et al. 1998, KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS 1999).

### Nachweis viraler DNA durch PCR

PHALEN et al. (2001) entwickelten eine PsHV-spezifische PCR zum Nachweis der herpesviralen DNA aus verschiedenen Geweben und Zellkultur unter Verwendung von 5 Primerpaaren. Die besten Ergebnisse werden bei Verwendung von kombinierten Rachen- und Kloakentupfern und Blutproben der zu testenden Vögel erzielt. Auf diese Weise gelingt auch die Identifikation subklinischer Ausscheider.

### Serologische Diagnostik

Aufgrund der Fähigkeit zur Latenz spielt die serologische Diagnostik bei Herpesinfektionen eine wichtige Rolle, da das Virus selbst während der Latenz nicht nachweisbar ist und der Versuch eines Virusnachweises damit zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann, während der Nachweis spezifischer Antikörper im Serum auch im Stadium der Latenz gelingt.

Über die Prävalenz von Serumantikörpern gegen PsHV gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse. Da latent infizierte Papageien und Sittiche das Virus möglicherweise über einen langen Zeitraum nicht ausscheiden, könnte die virologische Untersuchung mittels Tupferproben bei solchen Vögeln ein falsch-negatives Ergebnis liefern. Zum Nachweis von Serumantikörpern gegen PsHV wird der Serumneutralisationstest angewendet, der aber in der Durchführung für Routinescreening in der Bestandsdiagnostik sehr aufwendig ist und aufgrund der verschiedenen Serotypen und der geringen Sensitivität zum Teil falsch negative Ergebnisse liefert.

## **2.1.7 Therapie**

### 2.1.7.1 In-vitro-Studien zur Wirksamkeit von Acyclovir

In infizierten HEF-Zellkulturen führte Acyclovir in einer Konzentration zwischen 3.1 und 25 µg/ml zu einer deutlichen Hemmung der Neusynthese von PsHV. Die vollständige Unterbindung der Synthese neuer viraler Proteine gelang allerdings nicht (ESKENS et al. 1994).

### 2.1.7.2 Effekte und Nebenwirkungen in vivo

In vivo kann die Vermehrung von Herpesviren chemotherapeutisch durch Acyclovir und Gancyclovir beeinflusst werden, da diese die Thymidin-Kinase der Viren und damit die Neusynthese viraler DNA hemmen. Acyclovir kann intramuskulär oder per os verabreicht werden, wobei bei der Injektion Gewebsirritationen auftreten können. Die Angaben über Dosierung und Behandlungsintervalle variieren bei den einzelnen Autoren zum Teil erheblich.

Erste Hinweise auf die Wirksamkeit von Acyclovir ergaben sich bei einem Ausbruch in einem privaten Psittazidenbestand: Gefährdeten Vögeln wurde einmalig 25 mg/kg Acyclovir intramuskulär verabreicht, gefolgt von einer Verabreichung von 1 mg/ml über das Trinkwasser und 400 mg pro kg im Körnerfutter. Sieben von acht auf diese Weise behandelte Psittaziden überlebten den Ausbruch, während sieben unbehandelte Vögel starben (SMITH 1987).

Nach experimenteller Infektion stellten NORTON et al. (1991) eine verringerte Mortalität bei Injektion von 80 mg/kg Acyclovir im Abstand von 8 Stunden über 7 Tage fest, bemängelten aber die schlechte Verträglichkeit sowohl bei intramuskulärer als auch bei subkutaner Injektion sowie das Risiko eventueller Virusübertragung von Tier zu Tier bei häufiger Manipulation. Eine Anzahl weiterer Autoren bestätigt den positiven Effekt von Acyclovir bei der Bekämpfung von Pacheco-Ausbrüchen (MAGNINO et al 1996; GYLSTORFF, GRIMM 1998; KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS 1999). Unterstützend wird symptomatisch therapiert (Flüssigkeitssubstitution, Vitamingaben, Antibiose).

## 2.1.8 Immunprophylaxe

### 2.1.8.1 Kommerzielle Vakzine

Die Wirksamkeit einer inaktivierten PsHV-Vakzine bewiesen GASKIN et al. (1980) bei geimpften Mönchsittichen, die trotz niedriger Antikörpertiter (1:8 bis 1:64) im Serumneutralisationstest bei experimenteller Infektion nicht erkrankten. Eine in Europa entwickelte Vakzine induzierte die Bildung von Antikörpern, die bei einigen Vögeln über einen Zeitraum von 7 Monaten nachweisbar waren (KALETA und

BRINKMANN 1980). Eine kombinierte inaktivierte Polyomavirus- und PsHV-Vakzine erwies sich in experimentellen Studien als immunogen und effektiv und verursachte aufgrund des Aluminiumhydroxid-Adjuvans sowohl bei intramuskulärer als auch bei subkutaner Injektion keine Gewebsreizungen (RITCHIE et al. 1997). In den USA ist eine inaktivierte Vakzine im Handel, die PsHV Serotyp 1 enthält und zuverlässig vor Erkrankung durch diesen Serotyp schützt, aufgrund des Mineralöl-Adjuvans aber häufig zu lokalen und systemischen Reaktionen führt und keinen Schutz vor anderen Serotypen bietet (MAGNINO et al. 1996, SCHRÖDER-GRAVENDYCK et al. 2001).

#### 2.1.8.2 Bestandsspezifische Vakzine

Die Herstellung und Anwendung bestandsspezifischer Vakzinen wurde in mehreren Fällen versucht (KALETA und BRINKMANN 1993, STEINKE 1998). So wurde an der Justus-Liebig-Universität anlässlich eines Ausbruchs in einem Zuchtbestand eine aus den gestorbenen Vögeln entwickelte durch Formaldehyd und Hitze inaktivierte bestandsspezifische Vakzine hergestellt. 12 Tage nach Ausbruch erfolgte die Impfung aller klinisch gesunden Papageien. Die Boosterung wurde nach 4 Wochen durchgeführt, eine weitere Auffrischungsimpfung nach einem Jahr. Alle geimpften Tiere überlebten. Die Bildung von Antikörpern wurde durch mehrmalige serologische Untersuchungen bestätigt. Verlängert wurde der Impfschutz mittels einer kommerziellen Vakzine, die inaktiviertes Virus enthielt. Dies führte bis zu einem Jahr zur Konstanthaltung der Serumantikörpertiter (STEINKE 1998).

## 2.2 Aviäre Immunglobuline

Bei elektrophoretischer Auftrennung der Serumproteine sind Immunglobuline Bestandteil der Gammaglobulinfraktion. In Anlehnung an die Säugerimmunglobuline wurden die bei den bisher untersuchten Vogelspezies nachgewiesenen Immunglobulinklassen als IgM, IgY (entspricht dem Säuger-IgG) und IgA klassifiziert (NEUMANN, KALETA 1992).

Alle bisher untersuchten aviären Immunglobulinklassen besitzen eine gemeinsame Grundstruktur: Sie bestehen aus jeweils 2 langen/schweren („heavy“) und 2 kurzen/leichten („light“) Polypeptidketten. Die H-Ketten untereinander und die H- und

L-Ketten sind über Disulfidbrücken zu einem Y-förmigen Immunglobulin-Molekül verbunden. Diese Konfiguration entspricht dem IgY-Molekül. Fünf derartige Moleküle, die mittels Disulfidbrücken zu einem Pentamer vereinigt werden, bilden ein IgM-Molekül, während das IgA-Molekül ein Di- oder Trimer darstellt. Die verschiedenen Ig-Klassen unterscheiden sich im Molekulargewicht, Kohlenhydratgehalt und in ihrer metabolischen Halbwertszeit. Durch Aminosäuresequenzierungen der sogenannten konstanten Regionen der H-Ketten und mithilfe spezifischer Antiseren kann eine Differenzierung der H-Ketten von IgM, IgY und IgA erfolgen.

Immunglobulinmoleküle können enzymatisch aufgetrennt werden in ein Fab-Fragment (Fragment-antigen-binding) und ein Fc-Fragment (Fragment crystallizable). Das Fab-Fragment enthält den variablen (V-) Bereich der H- und L-Ketten, bestehend aus jeweils etwa 110 Aminosäurenresten mit einigen hypervariablen Regionen, in denen die Aminosäuresequenzen stark variieren. Diese hypervariablen Regionen bilden die Antigenbindungsstellen für die Antigen-Antikörper-Bindung und bestimmen die Antigenpezifität. Weitere wichtige Bezirke an den H- und L-Ketten stellen die konstanten (C-) Regionen dar, die eine Effektorfunktion erfüllen und als Folgeaktion der Antigenbindung beispielsweise eine Stimulation von B-Zellen oder Aktivierung des Komplementsystems bewirken. Über das Fc-Fragment erfolgt die Anlagerung von Immunglobulin-Antigen-Komplexen an Zellen mit Fc-Rezeptor, also beispielsweise Makrophagen (NEUMANN, KALETA 1992).

Untersuchungen zum Molekulargewicht aviärer Immunglobuline wurden überwiegend beim Nutzgeflügel, insbesondere bei Huhn und Ente, durchgeführt. Das Molekulargewicht des nicht-reduzierten IgY liegt beim Huhn zwischen 165 und 206 kD, das der schweren Kette bei 67 bis 68 kD. Untersuchungen an Enten-IgY ergaben, dass hier zwei Isoformen von IgY existieren. Die größere entspricht strukturell dem IgY des Huhnes (HIGGINS 1996). Für die H-Ketten wurde ein spezifisches Molekulargewicht von 62-66 kD ermittelt, die L-Ketten lagen bei 22-24 kD, ohne Reduzierung betrug das molekulare Gewicht 118 (kurze Form) bzw. 178 kD (lange Form). Untersuchungen zu Tauben-Immunglobulinen weisen darauf hin, dass eine weitestgehende strukturelle Ähnlichkeit mit Hühner-IgY besteht (HIGGINS 1996). In Untersuchungen zum Molekulargewicht von Tauben-Immunglobulinen



wurde für das nicht-reduzierte IgY ein Molekulargewicht von 170 kD ermittelt, die leichte Kette ergab im SDS-Page eine Bande bei etwa 24 kD, die schwere Kette bei etwa 60 kD (ENGBERG et al. 1992).

### **2.3 Anwendung des ELISA in der Serodiagnostik aviärer Virusinfektionen**

Der ELISA ist in der Durchführung einfacher und schneller als der Neutralisationstest, und außerdem unabhängig von der Bereitstellung geeigneter Zellkulturen und der damit verbundenen räumlichen und technischen Ausstattung. Daher wird der ELISA auch in der Diagnostik zahlreicher Krankheiten des Nutzgeflügels eingesetzt, zum Beispiel zur Detektion von Serumantikörpern gegen Infektiöse Bursitis (HOWIE, THORSEN 1981), infektiöse Bronchitis (MOCKETT, DARBYSHIRE 1981), Adeno- (DAWSON 1980) und Reovirusinfektionen (SLAGHT et al. 1978) des Huhnes. Aufgrund der einfachen und schnellen Anwendung findet der ELISA vor allem bei Bestandsuntersuchungen Verwendung, um den Infektionsstatus einer Population oder einen Impftiter zu überwachen.

Auch in der Diagnostik aviärer Herpesvirusinfektionen wird der ELISA routinemäßig eingesetzt: Ein ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Infektiöse Laryngotracheitis (ILT) des Huhnes erkannte im Vergleich zum Serumneutralisationstest 16- bis 32fach höhere Titerstufen (YORK et al. 1982). Untersuchungen von MEULEMANS und HALEN (1982) und BAUER et al. (1999) bestätigen die hohe Sensitivität des ELISA und seine Eignung als Routineverfahren zum Screening nach ILT-Antikörpern in Hühnerseren.

Für die Ziervogeldiagnostik existieren aufgrund der Speziesvielfalt und der geringen Tierzahlen keine kommerziellen Antikörper für die Durchführung von Immunoassays. Die benötigten Antikörper müssen daher für die jeweilige Vogelart als Hyperimmunserum selbst hergestellt werden. Sinnvoll ist der Einsatz von Hyperimmunseren, die aufgrund der Kreuzreaktivität ein breites Spektrum verschiedener Spezies erkennen.

## 2.4 Kreuzreaktivitäten bei polyklonalen Hyperimmunseren

Im Gegensatz zu Säugetieren ist der Einsatz polyklonaler Antiseren in der Diagnostik der Geflügelkrankheiten weit verbreitet. Insbesondere beim Nutzgeflügel gibt es zahlreiche Untersuchungen bezüglich der Kreuzreaktivität bei verschiedenen Spezies. Die Eignung eines gegen Immunglobuline einer bestimmten Spezies gerichteten Hyperimmunserums für den Einsatz bei einer anderen Spezies ist abhängig von der Distanz der beiden Spezies in der phylogenetischen Entwicklung ihrer Immunsysteme (HIGGINS 1996). Häufig wird gegen Hühner-IgY gerichtetes Hyperimmunserum für die Diagnostik bei anderen Nutzgeflügelarten eingesetzt.

Eine breit gefächerte, aber unvollständige Kreuzreaktivität zwischen Serumproteinen von Fasan, Ente, Huhn, Pute, Taube und Spatz bewiesen BAXENDALE et al. (1971) unter Verwendung eines Kaninchenhyperimmunserums gegen Tauben- und Hühner-IgY. Mithilfe eines gegen Enten-IgY gerichteten Kaninchen-Hyperimmunserums wiesen CROMIE et al. (1993) Antikörper gegen Mykobakterien bei verschiedenen Gänse- und Entenspezies nach. Zur Detektion von Antikörpern gegen Entenhepatitis bei verschiedenen Enten- und Gänsearten wurde Ziegenhyperimmunserum gegen Hühner-IgY erfolgreich im ELISA eingesetzt (HALPERN et al. 1987).

In einer Studie bezüglich der Kreuzreaktivität eines Nymphensittich-IgY-spezifischen Kaninchen-Hyperimmunserums wurde die Reaktivität des polyvalenten Hyperimmunserums mit Seren von acht anderen Psittazidenarten, darunter Graupapageien, Kakadus, Edelpapageien, Wellensittiche, Aras und Amazonen untersucht (BAGHIAN et al. 1999). Dazu wurden Serumproteine aus einem Pool von Nymphensittich-Seren durch Ammoniumsulfat ausgefällt. Außerdem wurde mit einem kommerziellen Kit das IgY aus Nymphensitticheiern extrahiert. Beide Extraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Anfärben mit Coomassie-Blue wurde die IgY-Fraktion herausgeschnitten, in PBS suspendiert und einem Kaninchen intraperitoneal mehrmals im 4-wöchigen Abstand injiziert. Das von diesem Kaninchen gewonnene Hyperimmunserum zeigte im Gel-Immunodiffusionstest eine gute Kreuzreaktivität mit dem Serum-IgY aller getesteter Psittaziden, nicht aber mit Haushuhn und Strauß. Die Kreuzreaktivität wurde durch Immunelektrophorese und

ELISA bestätigt, wo es an die Serumproteine aller untersuchter Psittazidenspezies gebunden wurde. Der Einsatz im Immunoblot bewies die Eignung des Hyperimmunserums zum Nachweis von Antikörpern in Seren von Nymphensittichen nach Vakzinierung mit Chlamydien-Antigen.

### 3 MATERIAL und METHODEN

#### 3.1 SDS-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE )

Für die Auftrennung von Proteinen im SDS-PAGE wurden die Proben mit reduzierendem bzw. nicht reduzierendem Probenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzt und anschließend 6 Minuten bei 100 °C im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlung der Proben wurden je 15 µl in die mit Laufpuffer bedeckte Tasche des Sammelgels gegeben. Die Auftrennung erfolgte in einer Minigel-Elektrophoresekammer (Mighty Small II, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) im 8 %- oder 10%-Trenngel unter Kühlung bei 200 V und 40 mA (Laufzeit je ca. 100 Minuten). Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurde das Gel über Nacht mit Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend in Entfärberlösung entfärbt. Zur Konservierung wurde das gefärbte Gel für 24 Stunden in Fixiererlösung eingelegt. Das so präparierte Gel konnte ohne Risse eingespannt in einem Rahmen zwischen Gel-Drying-Film (Promega, Mannheim) getrocknet werden. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes wurde ein Protein-Standard-Marker (SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Protein Standard, Invitrogen BV, Karlsruhe) mitgeführt, der unverdünnt in einer Menge von 10 µl eingesetzt wurde.

Verwendete Materialien:

- 10 % Trenngel:

- 5 ml Aqua dest.
- 4 ml Acrylamid-Stammlösung
- 3 ml Trenngelpuffer
- 60 µl SDS 20 % (Roth, Karlsruhe)
- 8 µl TEMED (SIGMA-Aldrich, Steinheim)
- 100 µl Ammoniumpersulfat-Lösung

- 8 % Trenngel:

- 5.8 ml Aqua dest.
- 3.2 ml Acrylamid-Stammlösung
- 3.0 ml Trenngelpuffer
- 60 µl SDS 20 % (Roth, Karlsruhe)

8 µl TEMED (SIGMA-Aldrich, Steinheim)

100 µl Ammoniumpersulfat-Lösung

- Acrylamid-Stammlösung:

15 g Acrylamid (Merck, Darmstadt)

0.4 g Bisacrylamid (Merck, Darmstadt)

ad 50 ml Aqua dest.

- Trenngelpuffer:

90.9 g Trishydroxymethylaminomethane (= 1.5 M) (Fluka Chemie, Neu-Ulm)

mit HCl auf pH 8.8 titriert

ad 500 ml Aqua dest.

- Ammoniumpersulfat-Lösung:

100 mg Ammoniumpersulfat (SIGMA-Aldrich, Steinheim)

ad 1 ml Aqua dest.

- Sammelgel:

4 ml Aqua dest.

1 ml Acrylamid-Stammlösung

1 ml Sammelgelpuffer

30 µl SDS 20 %

4 µl TEMED

100 µl Ammoniumpersulfat-Lösung

- Sammelgelpuffer:

9 g Trishydroxymethylaminomethane (= 0.75 M) (Fluka Chemie, Neu-Ulm)

mit HCL auf pH 6.8 titriert

ad 100 ml Aqua dest.

- Nicht-reduzierender Probenpuffer nach FREEMAN/GOODCHILD/MAGER :

0.657 g 0.4 M Natrium-1-Pentansulfonat (Riedel-de Haen, Seelze)

5.15 ml Aqua dest.

2.5 ml SDS 10 %

1 ml Glycerol (SIGMA-Aldrich, Steinheim)

0.1 ml Bromphenolblau (0.4 % in Ethanol) (SIGMA-Aldrich, Steinheim)

1.25 ml Tris-HCl-Puffer (pH 6.8) (Roth, Karlsruhe)

- Reduzierender Probenpuffer (SIGMA-Aldrich, Steinheim):

2.08 ml Trishydroxymethylaminomethane (1.5 M, pH 6.8)

1 g SDS (10 %)

4 ml Glycerin (40 %) (SIGMA-Aldrich, Steinheim)

1.5 ml Aqua dest.

2.5 ml Mercaptoethanol (25 %) (SIGMA-Aldrich, Steinheim)

2.5 mg Bromphenolblau (SIGMA-Aldrich, Steinheim)

- PBS zur Verdünnung der Proben:

8.0 g NaCl

0.2 g KCl

1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1000 ml Aqua dest.

- Laufpuffer für Elektrophorese (oberes und unteres Reservoir):

3.02 g Trishydroxymethylaminomethane

14.4 g Glycin

5 ml SDS (20 %)

ad 100 ml Aqua dest.

- Coomassie-Färbelösung:

480 mg Coomassie Brilliant Blue R 250 (Merck, Darmstadt)

50 ml Methanol

200 ml Eisessig

900 ml Aqua dest.

- Entfärber:

100 ml Methanol

150 ml Eisessig

1750 ml Aqua dest.

- Fixierer/Trockner:

200 ml Methanol

50 ml Glycerol

37.5 ml Essigsäure (Merck, Darmstadt)

ad 500 ml Aqua dest.

### **3.2 Western-Blot**

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran (Hyobond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geblottet (40 V, 250 mA, Blotzeit 40 Minuten; Blotgerät: Fastblot B 33, 10 Watt, Biometra, Göttingen). Diese wurde anschließend 1 Stunde in PBS-Tween mit 2 % Magermilchpulver geblockt, um unspezifische Bindungsstellen für den folgenden Western Blot abzublocken. Die Nitrozellulose wurde getrocknet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zum Western Blot aufbewahrt.

Die Nitrozellulose wurde unter Agitation 60 Minuten lang mit dem Tauben-IgY-spezifischen Hyperimmunserum (1 : 1000 verdünnt in PBS-Tween mit 2 % Magermilch) bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in 4 Waschgängen von je 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen und 30 Minuten mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-IgG-spezifischen Ziegenantiserum (SIGMA-Aldrich, Steinheim) der Verdünnung 1 : 40 000 (ebenfalls in PBS-Tween mit 2 % Magermilch) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach weiteren vier Waschgängen von je fünf Minuten wurde Hyobond ECL+Plus Western blotting detecting reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden), das nach Herstellerangaben angemischt wurde, auf die Nitrozellulose aufgetragen. Nach fünf Minuten Inkubationszeit wurde die Nitrozellulose in eine Klarsichtfolie eingelegt und in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die Belichtungszeit betrug je nach Intensität der Banden 5 bis 10, im Bedarfsfall bis zu 30 Sekunden.

Verwendete Materialien:

- Blotpuffer:

6.05 g Trishydroxymethylaminomethane  
28.13 g Glycin  
500 ml Methanol  
ad 2.5 l Aqua dest.

- PBS-Tween 0.1 % mit 2 % Magermilchpulver:

2 g Magermilchpulver  
ad 100 ml PBS-Tween 0.1 %

- PBS-TWEEN 0.1 %:

10 ml Tween 20 (Polyethylensorbitanmonolaurat) (Merck, Darmstadt)  
90 ml PBS (1x)  
1000 ml PBS (10x)  
ad 10 l Aqua dest.

- PBS (10x):

200 g NaCl  
5 g KCl  
36 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 2500 ml Aqua dest.

### **3.3 Virusanzucht und –aufreinigung**

Für den Einsatz im ELISA wurde PsHV-1 aus einer Hühnerembryofibroblasten-Zellkultur verwendet. Primäre Hühnerembryofibroblasten wurden mit PsHV-1 infiziert und ca. 2 Tage bis zum Eintreten des cytopathischen Effekts bei 41 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgelöst und zusammen mit dem Überstand bei – 70 °C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.



Nach dem Auftauen wurden grobe Zellreste durch 15minütige Zentrifugation bei 4000 Umdrehungen pro Minute (Beckmann Zentrifuge I2-21, Rotor IA-14) entfernt. Der Überstand wurde im Verhältnis 7:1 (wt/vol) mit Polyethylenglycol (PEG 8000, SIGMA-Aldrich, Steinheim) versetzt, durchmischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 6000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten (Beckmann Zentrifuge I2-21, Rotor IA-14) wurde das entstandene Viruspellet in ca. 1/10 des Originalvolumens in PBS resuspendiert und durch Ultrazentrifugation (27 000 rpm / 1 Stunde) durch ein dreißigprozentiges Sucrosekissen pelletiert (Beckmann Zentrifuge LI-50B).

Das Pellet wurde in ca. 2 ml PBS resuspendiert und auf einen Sucrosegradienten (70 bis 30 %; Merck, Darmstadt) pipettiert, in dem PsHV nach 15stündiger Zentrifugation bei 27 000 Umdrehungen pro Minute (Beckmann Zentrifuge LI-50B) im 60 %-Bereich als deutliche Bande anreichterte. Die Bande wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in PBS resuspendiert. Nach Verdünnung (1 / 10) wurde das gradientengereinigte Virus durch finale 60minütige Zentrifugation bei 27 000 Umdrehungen pro Minute (Beckmann Zentrifuge LI-50B) pelletiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet aus gefälltem aufgereinigtem PsHV-1 in einer kleinen Menge (1-2 ml) PBS gelöst und bei – 70 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

### **3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung des aufgereinigten PsHV und Proteinassay**

Vor dem Einsatz im Immunoassay wurde das resuspendierte Pellet nach Negativkontrastierung mittels Phosphorwolframsäure im Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10) auf Herpesviren untersucht. Anschließend wurde in einem Proteinassay (Biorad, München) die Menge an enthaltenem Gesamtprotein bestimmt.

### **3.5 Auswahl und Einteilung der Psittazidenserum für ELISA und Western Blot**

Im ELISA wurden insgesamt 1078 Seren getestet. Alle ELISA-positiven und ein Teil der ELISA-negativen Seren wurden im Western Blot nachgetestet. Diese Seren wurden in Untergruppen unterteilt:

#### I. Seren aus Bestandsroutineuntersuchungen auf aviäre Paramyxoviren:

Für die Untersuchung standen 750 Seren aus 14 verschiedenen Beständen mit 16 bis 92 Tieren pro Untersuchungsgruppe zur Verfügung. Diese Seren wurden im Rahmen von Kontrolluntersuchungen eingesandt und stammten von klinisch gesunden Tieren.

Bei Bestand Nr.1 handelt es sich um Seren aus einer frisch importierten Gruppe von Amazonen, die noch in der Quarantäne getestet wurden. Auch bei diesen Vögeln waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine klinischen Symptome vorhanden. Die Bestände 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12 und 14 bestanden ebenfalls aus Psittaziden in oder kurz nach der Importquarantäne. Die Seren von Bestand 4, 6 und 7 stammen von einem Großhändler für Papageienvögel. Bei Bestand 13 handelt es sich um einen privaten Bestand, bei dem aufgrund gehäufte Todesfälle Seren für die Diagnostik gewonnen wurden.

#### II. Seren von Einzeltieren (Gesamtzahl 328 Seren):

a) Einzeltiere mit Pacheco-Verdacht: Hier handelte es sich um Vögel, die klinische Symptome aufwiesen, die auf eine PsHV-Infektion hindeuteten oder Kontakt zu an Pacheco erkrankten Psittaziden hatten. Diese 30 Seren stammten aus der Klinik oder wurden zur Untersuchung an die Klinik eingeschickt.

b) Seren von Einzeltieren ohne klinischen Pacheco-Verdacht:

Die 298 Seren stammten aus der täglichen Routinediagnostik. Es handelte sich also um Seren aus der Klinik oder von Kollegen, die nach der serologischen oder chemischen Untersuchung bei – 70 °C aufbewahrt wurden. Im Vorbericht lag kein Hinweis auf eine Exposition zu PsHV-erkrankten Tieren oder klinische Symptome der Pachecokrankheit vor.

### 3.6 Pacheco-ELISA

Das aufgereinigte PsHV wurde mit 0.05m Bikarbonat-Puffer (pH 9.6) auf 10 µg/ml verdünnt und mit je 50 µl pro Vertiefung dieser Verdünnung in 96-Loch-Polysorb-ELISA-Platten (Nunc, Karlsruhe) überführt. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde mit 0.025%igem PBS-Tween gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit PBS-Tween mit 2 % Magermilchpulver geblockt (100 µl / Vertiefung). Nach Abgießen des Blockpuffers wurden die Platten entweder direkt benutzt oder bis zur Verwendung bei – 20 °C aufbewahrt.

Bei der Durchführung des ELISA wurden jeweils 50 µl der 1:50 vorverdünnten (Blockpuffer) Patientenseren in 2 Vertiefungen der vorbereiteten ELISA-Platten pipettiert. Als Kontrollseren und zur Berechnung der Standardabweichung wurden drei Negativseren sowie ein Positivserum mitgeführt. Als Konjugatkontrolle (PBS-Tween 0.025% mit 2% Magermilchpulver) dienten 2 Vertiefungen, die nur PBS enthielten. Nach 30minütiger Inkubation der Platten bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen mit PBS-Tween (0.025%) erfolgte die Inkubation mit je 50 µl des Tauben-IgY-spezifischen Hyperimmunserums in der Verdünnung 1 : 100 (mit Blockpuffer) bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Nach drei weiteren Waschgängen wurden je 50 µl pro Vertiefung eines Peroxidase-konjugierten Kaninchen-IgG-spezifischen Ziegenantiserums (SIGMA-Aldrich, Steinheim) in der Verdünnung 1:1000 auftragen, wieder 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal gewaschen.

Die Substratreaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl eines frisch hergestellten Gemisches aus 1mg OPD (o-Phenyldiamindihydrochlorid; SIGMA-Aldrich, Steinheim) und 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) pro 1 ml Citratpuffer (0.05 M) eingeleitet und nach 10 Minuten Reaktionszeit in Dunkelheit bei Raumtemperatur durch Zugabe von 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt (50 µl pro Vertiefung). Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion im ELISA-Reader bei 490 nm.


Aus den Extinktionswerten der Negativ-Kontrollseren wurde die Standardabweichung berechnet und der „Cut off“ (der Schwellenwert der Extinktion, ab dem ein Serum als ELISA-positiv gewertet wurde) definiert als dreifache Standardabweichung.

Verwendete Materialien:

- Bicarbonat-Puffer (0.05 M, pH 9.6)  
4.2 g NaHCO<sub>3</sub>  
ad 1 l Aqua dest.
  
- PBS-Tween 0.025%  
2.5 ml Tween 20 (Polyethylensorbitanmonolaurat) (Merck, Darmstadt)  
90 ml PBS (1x)  
1000 ml PBS (10x)  
ad 10 l Aqua dest.
  
- Citratpuffer (0.05 M):  
14.7 g Na-Citrat  
ad 1 l Aqua dest.

### 3.7 PsHV-Western Blot

Zur Überprüfung der ELISA-Ergebnisse wurde der Western Blot als Referenzverfahren durchgeführt. Als Antigen diente wie im ELISA das gradientengereinigte PsHV (Konzentration 1.71 mg/ml, Endverdünnung 1: 10) aus der HEF-Zellkultur. Die Auftrennung der Virusproteine erfolgte im SDS-PAGE (je 300 µl pro Sammelgel) wie unter Punkt 3.1. beschrieben. Im Western Blot wurden einzelne Nitrozellulosestreifen mit jeweils 1 ml der vorverdünnten Patientenseren (1:2000 in PBS) über Nacht bei 4 °C unter ständiger Agitation inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem Tauben-IgY-spezifischen Hyperimmunserum und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-IgG-spezifischem Ziegenantiserum wie unter Punkt 3.2. beschrieben. Die Belichtungszeit betrug 5 – 30 Sekunden.

Verwendete Materialien: Siehe Punkt 3.1 und 3.2 

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Kreuzreaktivität des Hyperimmunserums im SDS-PAGE und Western Blot

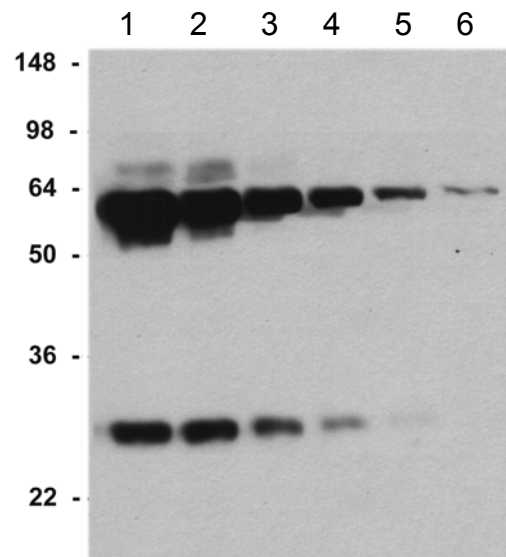
#### 4.1.1 Reaktivität mit Tauben-IgY

Die Überprüfung der Spezifität und Kreuzreaktivität des gegen Tauben-IgY gerichteten Kaninchenhyperimmunserums mit Serumproben verschiedener Vogelarten erfolgte im Western Blot. Bei Verwendung von reduzierendem Probenpuffer kann beurteilt werden, ob das Kaninchenhyperimmunserum spezifisch an die leichte und/oder schwere Kette der reduzierten Immunglobuline im jeweiligen Serum bindet. Werden Seren ohne Reduzierung eingesetzt, kann überprüft werden, ob eine Bindung auch an intakte Immunglobuline erfolgt. Als Positivkontrolle wurde Taubenserum verwendet. Die leichte Kette der Immunglobuline ergab eine Bande bei 28 kD, die schwere Kette bei 60 kD. Ohne Reduzierung lag das molekulare Gewicht der Immunglobuline bei 130 kD.

Als Vorversuch wurde in einer Titration die Reaktivität des reduzierten und nicht reduzierten Taubenserums beim Einsatz im SDS-PAGE ermittelt. Dazu wurde das Taubenserum in einer Zweiverdünnungsreihe eingesetzt. Das Kaninchenhyperimmunserum reagiert unter reduzierenden Bedingungen mit Serumproteinen der Taube unter Bildung einer leichten und schweren Bande bei 28 und 60 kD. Dies korrespondiert mit dem Molekulargewicht der leichten und schweren Kette aviärer Immunglobuline. Die leichte Bande ist bis zu einer Verdünnung von 1:256 erkennbar. Die schwere Kette bei 60 kD wird in allen Verdünnungsstufen erkannt, bildet aber bei der ersten Verdünnungsstufe (1:32) keine scharfe Bande, sondern lagert sich breit im Bereich von etwa 62 bis 52 kD ab. Die Stufen 1:64 und 1:128 ergeben deutlich begrenzte Banden, während ab einer Verdünnung von 1:256 die leichte Bande zu verblassen beginnt. Die nicht denaturierte IgY-Fraktion wurde bei allen getesteten Seren erkannt und bildete eine Bande im Bereich von 130 kD. Durch eine Vielzahl unspezifischer Reaktionen mit anderen Serumproteinfraktionen entstanden mehrere Banden mit verschiedenen Molekulargewichten. Dadurch wurde die Auswertung erschwert. Weitere Untersuchungen zur Kreuzreaktivität erfolgten deshalb nach Denaturierung der Immunglobuline in leichte und schwere Kette. Im

nicht denaturierten Serum waren im Bereich von 60 kD Proteinfractionen nachweisbar, die aufgrund unspezifischer Bindungsreaktionen Banden ergaben. Daher kann auch bei Denaturierung nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Bande in diesem Bereich um die schwere Kette des IgY handelt. Um falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Bindungsreaktionen auszuschließen, wurden daher nur solche Spezies als positiv bezüglich der Kreuzreaktivität mit dem Tauben IgY-spezifischen Kaninchenhyperimmunserum bewertet, bei denen sowohl die leichte als auch die schwere Bande erkennbar war.

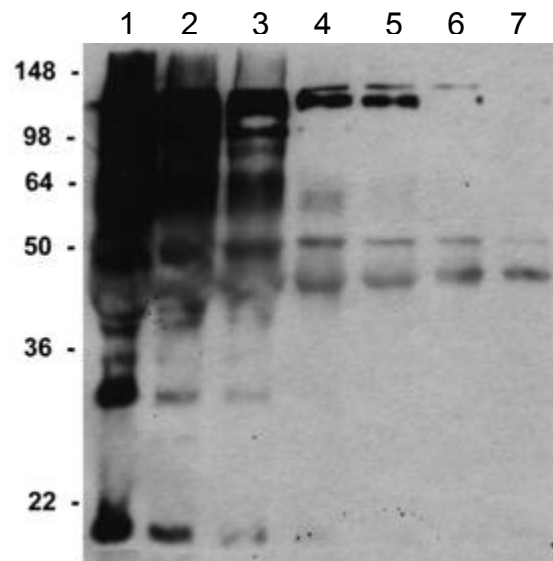
**Abbildung 1**  
**Reaktivität des**  
**gegen Tauben-IgY gerichteten**  
**Kaninchenhyperimmunserums**  
**unter reduzierenden Bedingungen**



*Dargestellt ist die Reaktion des gegen Tauben-IgY gerichteten Hyperimmunserums mit Taubenserumproteinen im Western Blot, Belichtungszeit 10 Sekunden. Als Konzentration des reduzierten Taubenserums wurde eine Zweierverdünnungsreihe gewählt mit den Verdünnungsstufen 1:32 (1), 1:64 (2), 1:128 (3), 1:256 (4), 1:512 (5) und 1:1024 (6).*

Da sich bei einer Verdünnung des reduzierten Taubenserums von 1:64 beide Banden am deutlichsten abzeichneten, wurde diese Verdünnung für die Positivkontrolle im Western Blot eingesetzt. Da beim Einsatz von Seren anderer Spezies zur Überprüfung der Kreuzreaktivität eine geringere Affinität des Hyperimmunserums erwartet wurde, wurden diese Seren nur 1: 32 verdünnt.

**Abbildung 2**  
**Reaktivität des gegen**  
**Tauben-IgY gerichteten**  
**Kaninchenhyperimmunserums**  
**unter nicht-reduzierenden**  
**Bedingungen**



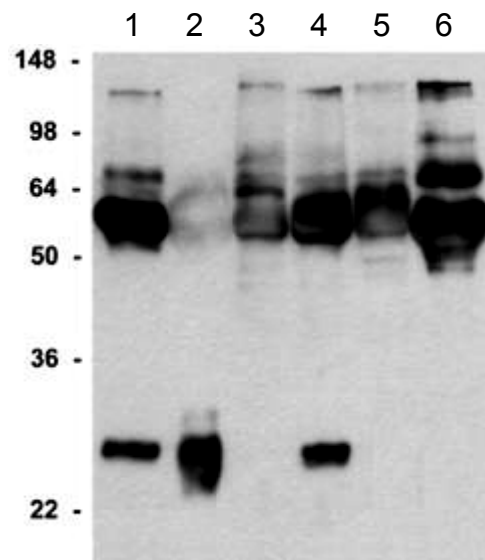
*Der Western Blot zeigt die Reaktion des gegen Tauben-IgY gerichteten Hyperimmunserums mit Serumproteinen eines nicht-reduzierten Taubenserums. Als Konzentration des Taubenserums wurde eine Zweiverdünnungsreihe gewählt mit den Verdünnungsstufen 1:8 (1), 1:16 (2), 1:32 (3), 1:64 (4), 1:128 (5), 1:256 (6), 1:512 (7). Belichtungszeit 10 Sekunden.*

Beim Einsatz von nicht reduziertem Taubenserum wurden die besten Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:64 und 1:128 erzielt. Deshalb wurde es als Positivkontrolle in der Endverdünnung 1:64 eingesetzt, die Seren anderer Spezies wegen der geringeren Affinität zum Hyperimmunserum in der Verdünnung 1:16. Dies ergab bei einigen Seren deutliche Banden, führte bei anderen aber bereits zur Überladung.

#### 4.1.2 Kreuzreaktivität der IgY-Serumkomponenten der Klasse Aves

Zur Überprüfung, welche Spezies eine Kreuzreaktivität bezüglich des hergestellten Hyperimmunserums aufweisen könnten, wurden verschiedene Psittaziden- und Nichtpsittaziden-Seren im SDS-PAGE eingesetzt und die Reaktivität des Tauben-IgY-spezifischen Hyperimmunserums im Western Blot überprüft. Dazu wurden Seren von Psittaziden sowie ein breites Spektrum an Nichtpsittaziden, darunter verschiedene Greifvögel, Nutzgeflügel, Wassergeflügel, Sperlingsvögeln und Straußenartige im Western Blot eingesetzt (siehe Abbildungen 3-6).

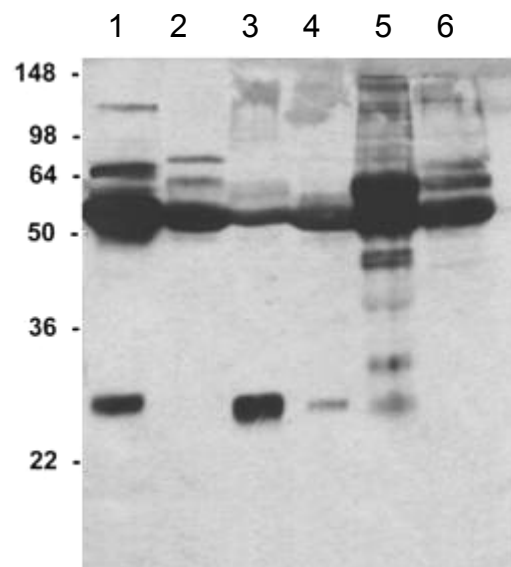
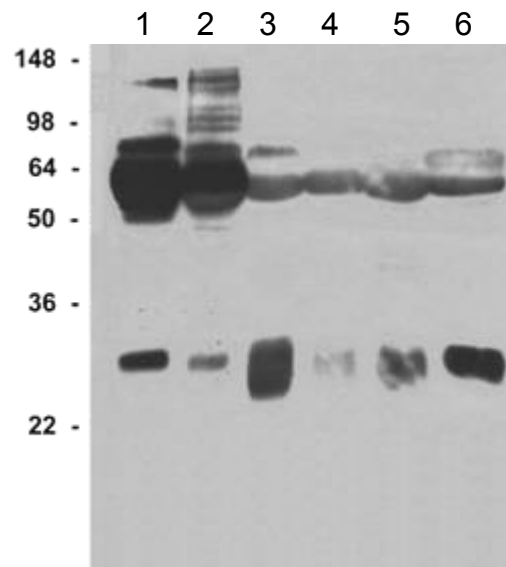
**Abbildung 3**  
***Reaktivität des Hyperimmunserums  
unter reduzierenden Bedingungen  
mit Serumbestandteilen  
verschiedener Spezies***



*Taube (1), Haushuhn (2), Nymphensittich (3), Graupapagei (4), Grünflügelara (5) und Inkakakadu (6). Serumverdünnung 1 : 32, Belichtungszeit 5 Sekunden.*



**Abbildung 4 und 5**  
**Reaktivität des**  
**Hyperimmunserums unter**  
**reduzierenden Bedingungen**  
**mit Serumbestandteilen**  
**verschiedener Spezies**



**Oben:**

Seren von Taube (1), Weißstorch (2), Höckerschwan (3), Hausgans (4), Stockente (5) und Pute (6).

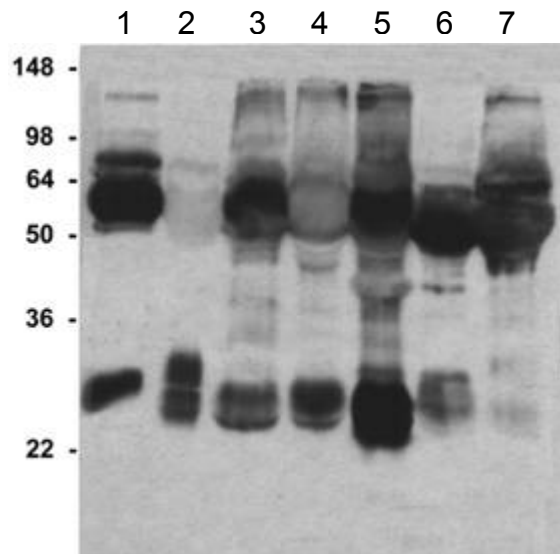
Serumverdünnung 1:32, Belichtungszeit 10 Sekunden.

**Unten:**

Seren von Taube (7), Wachtel (8), Pfau (9), Perlhuhn (10), Wellensittich (11) und Nymphensittich (12).

Serumverdünnung 1:32, Belichtungszeit 10 Sekunden.

**Abbildung 6**  
**Reaktivität des Hyperimmunserums**  
**unter reduzierenden Bedingungen**  
**mit Serumbestandteilen**  
**verschiedener Spezies**



*Taube (1), Haushuhn (2), Gerfalke (3), Kappapagei (4), Ger-Saker-Hybridfalke (5), Kanarienvogel (6) und Edelpapagei (7)*

*Serumverdünnung 1: 32, Belichtungszeit 15 Sekunden.*

Eine gute Kreuzreaktivität mit zwei deutlichen Banden zeigten ein Graupapageienserum sowie einzelne Seren z.B. von Weißstorch, Höckerschwan, Stockente, Pute, Pfau, Perlhuhn, Gerfalke, Ger-Saker-Hybridfalke, Kanarienvogel und Kappapagei (siehe Abbildungen).

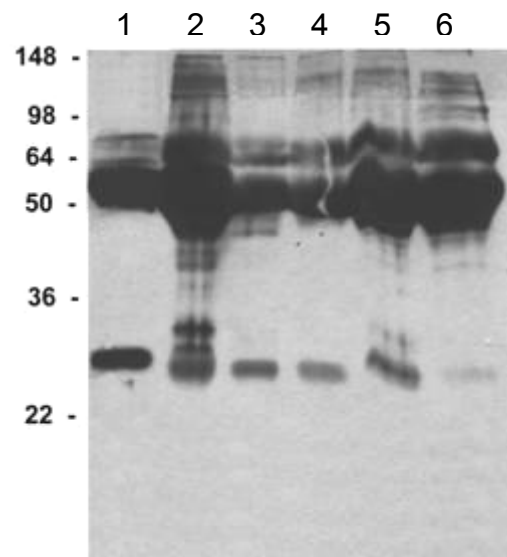
Bei einigen Seren wie z.B. Grünflügelara und Inkakakadu, Hausgans, Wachtel Nymphensittich und Edelpapagei wurde nur die schwere Kette erkannt. Diese Seren wurden in höherer Konzentration und mit längerer Belichtungszeit (30 Sekunden bis 2 Minuten) nachgetestet, um abzuklären, ob nur eine geringere Reaktivität oder eine fehlende Kreuzreaktivität vorlag. Dabei zeigte sich bei Nymphensittich, Wellensittich und Rosella weiterhin keine Bindung des Hyperimmunserums zur leichten Kette des Serum-IgY, während z.B. bei Amazonen, Kakadus und Aras eine Kreuzreaktivität mit beiden Ketten erkennbar war. Einige Seren, z.B. Haushuhn und Strauß, zeigten keine Kreuzreaktivität der schweren Kette des IgY und wurden daher als negativ bewertet.

### 4.1.3 Unterschiede innerhalb der einzelnen Spezies

Im Anschluss wurden bei Aras, Amazonen und Kakadus individuelle Unterschiede in der Kreuzreaktivität untersucht. Dabei war erkennbar, dass zur Darstellung beider Banden bei verschiedenen Spezies zum Teil unterschiedliche Belichtungszeiten nötig waren. So war z.B. bei Rosakakadu eine längere Belichtung (zum Teil über 30 Sekunden) zur Darstellung der leichten Bande notwendig als bei Gelbhauben-, Molukken- und Weißhaubenkakadu, wo klare Banden bereits bei 5-10 Sekunden Belichtungszeit erkennbar waren. Auch bei den Amazonen waren individuelle Unterschiede erkennbar. Deutliche Banden schon bei 5-10 Sekunden Belichtungszeit zeigten hier z.B. die getestete Blaustirn- und Venezuelaamazonen, während bei der Goldbauchamazonen in diesem Western Blot bei Standardkonzentration und normaler Belichtungszeit nur die schwere Kette erkannt wurde. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde die Bande bei 130 kD (nicht-reduziertes IgY) bei allen getesteten Seren erkannt, wobei die Auswertung zum Teil durch sehr breite Banden und die Ausbildung weiterer Banden erschwert wurde, so dass die weitere Beurteilung der Kreuzreaktivität mit denaturierten Seren durchgeführt wurde.

#### **Abbildung 7**

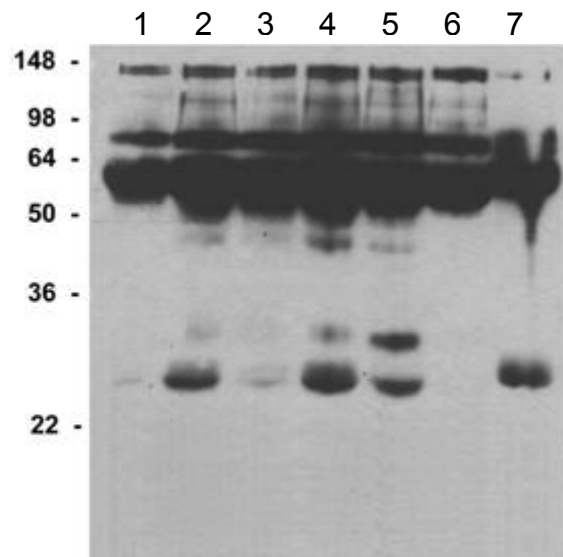
***Unterschiede der Reaktivität  
des Kaninchenhyperimmunserums  
bei verschiedenen Kakaduspezies  
unter reduzierenden Bedingungen***



*Taube (1), Gelbhauben- (2), Molukken- (3), Weißhauben- (4), Gelbhauben- (5) und Rosakakadu (6). Serumverdünnung 1:32, Belichtungszeit 20 Sekunden.*

**Abbildung 8**

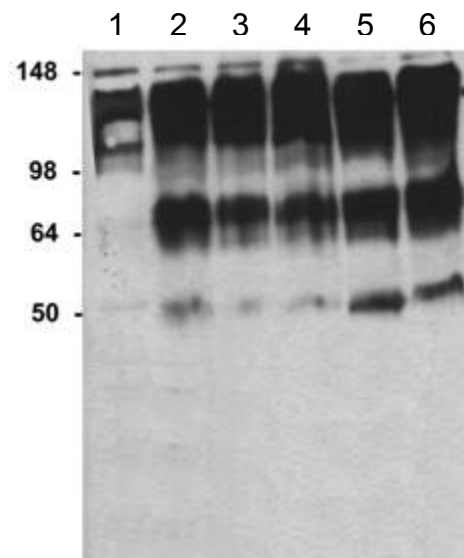
***Unterschiede der Reaktivität  
des Kaninchenhyperimmunserums  
bei verschiedenen Amazonenspezies  
unter reduzierenden Bedingungen***



*Gelbnacken- (1), Müller- (2), Gelbscheitel- (3), Blaustirn- (4), Venezuela- (5) und Goldbauchamazone (6), Taube (7). Serumverdünnung 1:32, Belichtungszeit 20 Sekunden.*

**Abbildung 9**

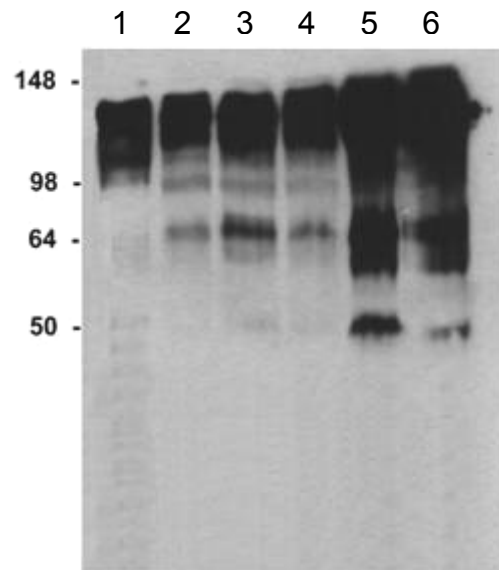
***Unterschiede der Reaktivität  
des Kaninchenhyperimmunserums  
bei verschiedenen Aras unter  
nicht-reduzierenden Bedingungen***



*Taubenserum (1), Soldatenara (2), Hellroter Ara (3), Rotbauchara (4), Zwergara (5), Dunkelroter Ara (6). Serumverdünnung 1: 64, Belichtungszeit 15 Sekunden.*

**Abbildung 10**

***Unterschiede der Reaktivität  
des Kaninchenhyperimmunserums bei  
verschiedenen Amazonenspezies unter  
nicht-reduzierenden Bedingungen***



*Taubenserum (1), Gelbscheitel- (2), Tucuman- (3), Blaustirn- (4), Venezuela- (5) und Mülleramazonzone (6). Serumverdünnung 1:64, Belichtungszeit 15 Sekunden.*

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Kreuzreaktivität wurden in Tabelle 1 zusammengefasst und ausgewertet. Dabei wurden alle denaturierten Seren als „positiv“ bewertet, die bei einer Konzentration von 1:8 bis 1:32 und einer Belichtungszeit von 5 – 60 Sekunden zwei erkennbare Banden bei 28 und 60 kD bildeten.

**Tabelle 1: Reaktivität des gegen Tauben-IgY gerichteten Hyperimmunserums mit IgY-Fragmenten verschiedener Spezies der Klasse Aves**

Deutscher Name	Lateinischer Name	28 kD	60kD	130kD
<b><u>Ordnung Struthioniformes (Straußenartige):</u></b>				
Strauß	Struthio camelus	---	---	---
<b><u>Ordnung Columbiformes (Tauben):</u></b>				
Texanertaube	Columba	+	+	+
<b><u>Ordnung Psittaciformes:</u></b>				
<b>Familie Psittacidae (eigentliche Papageien):</b>				
<b><u>Unterfamilie Aratinginae (Keilschwanzsittiche):</u></b>				
Soldatenara	Ara militaris	(+)	+	+
Hellroter Ara	Ara macao	(+)	+	+
Rotbauchara	Ara manilata	(+)	+	+
Zwergara	Diopsittaca nobilis	(+)	+	+
Dunkelroter Ara	Ara chloroptera	(+)	+	+
Gelbbrustara	Ara ararauna	(+)	+	*
Hyazinthara	Anodorhynchus hyacinthinus	(+)	+	*
<b><u>Unterfamilie Amazoninae (Amazonenartige):</u></b>				
<b>1.) Genus Amazona:</b>				
Gelbscheitelamazone	Amazona ochrocephala	(+)	+	+
Tucuman-Amazone	Amazona tucumana	(+)	+	+
Blaustirnamazone	Amazona aestiva	(+)	+	+
Venezuelaamazone	Amazona amazonica	(+)	+	+
Mülleramazone	Amazona farinosa	(+)	+	+
Gelbnackenamazone	A. ochrocephala auropalliata	(+)	+	*
Goldbauchamazone	Amazona xanthops	(+)	+	*
<b>2.) Genus Pionus:</b>				
Maximilianspapagei	Pionus maximiliani	+	+	*
Schwarzohrpapagei	Pionus menstruus	+	+	*
<b>3.) Genus Deroptylus:</b>				
Fächerpapagei	Deroptylus accipitrinus	+	+	*
<b><u>Unterfamilie Psittacinae (Graupapageien):</u></b>				
<b>1.) Genus Psittacus:</b>				
Graupapagei	Psittacus erithacus	+	+	+
<b>2.) Genus Poicephalus:</b>				
Kappapagei	Poicephalus robustus	(+)	(+)	*
Mohrenkopfpapagei	Poicephalus senegalus	(+)	(+)	*
<b><u>Unterfamilie Coracopinae (Rabenpapageien):</u></b>				
Vasapapagei	Coracopsis vasa	+	+	*

<b>Familie Psittaculidae (Edelpapageien):</b>				
<i>1.) Genus Psittacula:</i>				
Halsbandsittich	Psittacula krameri	+	+	*
<i>2.) Genus Eclactus:</i>				
Edelpapagei	Eclactus roratus	(+)	+	*
<b>Familie Polytelidae (Prachtsittiche):</b>				
Königssittich	Alisterus scapularis	+	+	*
Amboinasittich	Alisterus amboinensis	+	+	*
<b>Familie Platycercidae (Plattschweifsittiche):</b>				
Rosella	Platycercus eximius	---	+	*
Pennantsittich	Platycercus elegans	+	+	*
<b>Familie Melopsittacidae (Wellensittiche):</b>				
Wellensittich	Melopsittacus undulatus	---	+	+
<b>Familie Cacatuidae (Kakadus):</b>				
<i>Unterfamilie Cacatuine (eigentliche Kakadus):</i>				
Inkakakadu	Cacatua leadbeateri	(+)	+	+
Gelbwangenkakadu	Cacatua sulphurea	(+)	+	+
Molukkenkakadu	Cacatua moluccensis	(+)	+	+
Weißhaubenkakadu	Cacatua alba	(+)	+	+
Gelbhaubenkakadu	Cacatua galerita	(+)	+	+
Rosakakadu	Eolophus roseicapillus	(+)	+	+
<i>Unterfamilie Nymphicinae (Nymphensittiche):</i>				
Nymphensittich	Nymphicus hollandicus	---	+	+
<b>Ordnung Falconiformes (Falken):</b>				
Turmfalke	Tinnunculus tinnunculus	+	+	+
Gerfalke	Hierofalco rusticolus	+	+	*
Ger-Saker-Hybridfalke	Hierofalco rusticolus / cherrug	+	+	*
<b>Ordnung Accipitriformes (Greifvögel):</b>				
<b>Familie Accipitridae (Greife):</b>				
<i>Unterfamilie Aegyptiinae (Altweltgeier):</i>				
Mönchsgeier	Aegypius monachus	+	+	+
<i>Unterfamilie Accipitrinae (eigentliche Greife):</i>				
Habicht	Accipiter gentilis	+	+	+
Mäusebussard	Buteo buteo	---	+	+
Weißkopfsaadler	Haliaeetus leucocephalus	+	+	+
<b>Ordnung Ciconiiformes (Schreitvögel):</b>				
Weißstorch	Ciconia ciconia	+	+	+

<b><u>Ordnung Anatiformes (Anseriformes) (Entenartige):</u></b>				
<b><u>Unterfamilie Anserinae (Gänse):</u></b>				
Hausgans	Anser	+	+	+
Höckerschwan	Cygnus olor	+	+	+
<b><u>Unterfamilie Anatinae (Enten):</u></b>				
Stockente	Anas platyrhynchos	+	+	+
<b><u>Ordnung Phasianiformes (Galliformes) (Hühnervögel):</u></b>				
<b><u>Familie Phasianidae (Hühner, Fasanartige):</u></b>				
Perlhuhn	Numida meleagris	(+)	+	+
Pfau	Pavo cristatus	+	+	+
Truthuhn	Meleagris gallopavo	+	+	+
Haushuhn (Bankivahuhn)	Gallus gallus	+	---	+
Wachtel	Coturnix coturnix	---	+	+
<b><u>Ordnung Passeriformes (Sperlingsvögel):</u></b>				
Saatkrähe	Corvus frugilegus	(+)	+	*
Kanarienvogel	Serinus canaria	(+)	+	*

**Zeichenerklärung:**

- + deutliche Bande
- (+) keine oder schwache Bande, je nach Belichtungszeit
- keine Bande
- \* nicht getestet

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Bewertungskriterien ist eine Kreuzreaktivität des getesteten Hyperimmuserums mit Antikörpern fast aller getesteter Psittazidenseren gegeben (siehe Tabelle). Ausnahmen bilden hier Wellensittiche, Nymphensittiche und Rosellas, bei denen keine Kreuzreaktivität mit der leichten Kette bestand. Bei einigen Spezies war zur Darstellung der leichten Bande häufig eine längere Belichtungszeit nötig, vor allem bei Aras, Amazonen, Kakadus und Edelpapageien.

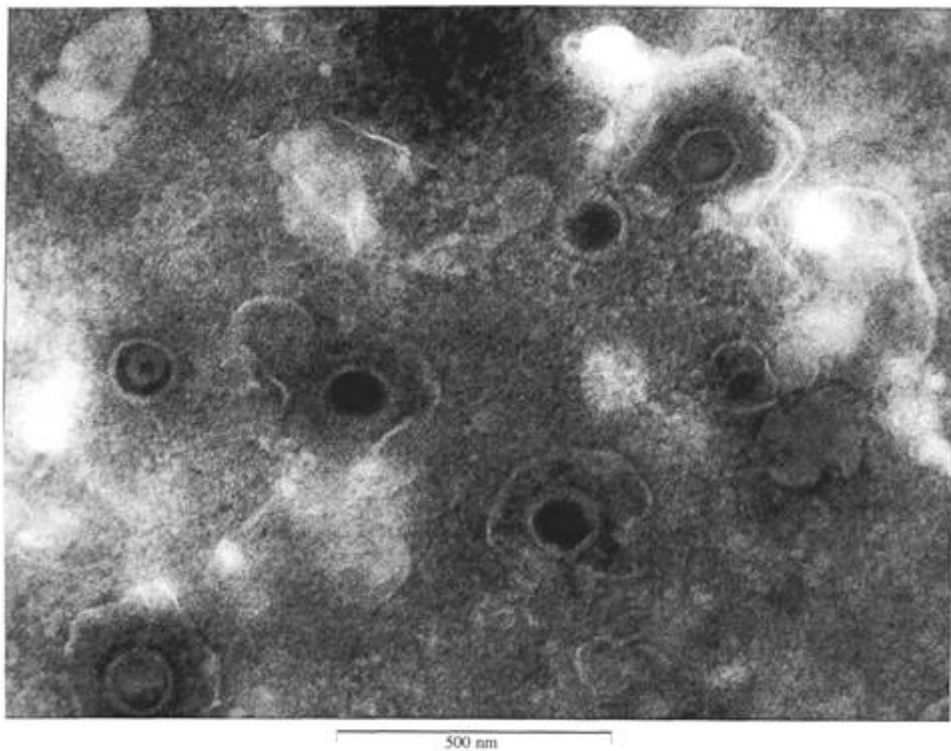
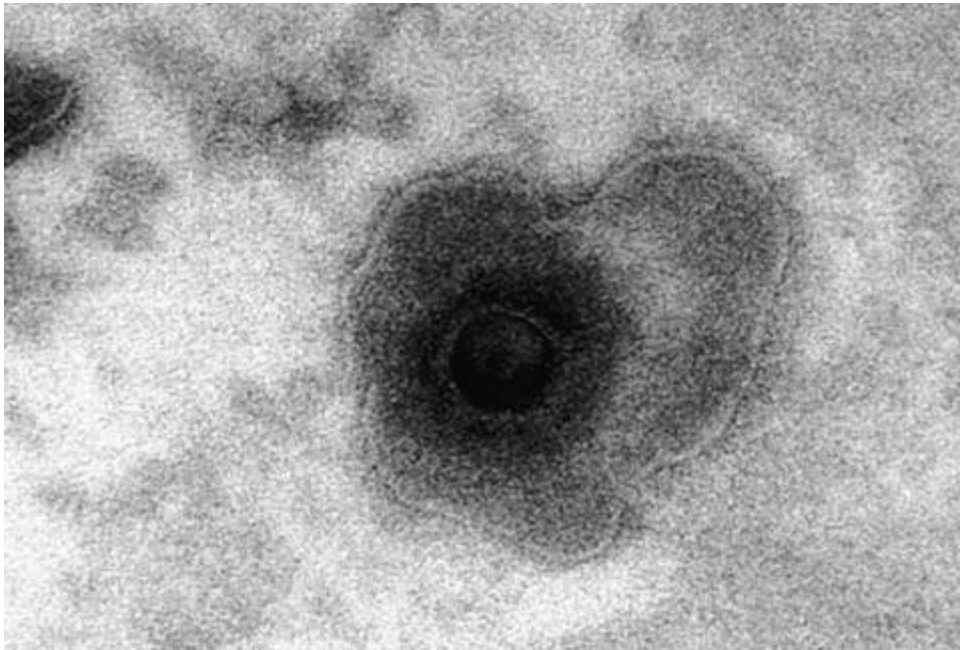
Bei den meisten Greif-, Hühner-, und Sperlingsvögeln bestand eine gute Kreuzreaktivität auch mit der leichten Kette. Ausnahmen waren hier Mäusebussard und Haushuhn. Beim Strauß war keinerlei Kreuzreaktivität nachweisbar.



Diese breite Reaktivität des Tauben-IgY-spezifischen Kaninchenhyperimmunserums deutet auf eine gute Eignung als sekundärer Antikörper in serologischen Immunoassays bei Psittazidenspezies hin.

#### **4.2 Qualitative und quantitative Untersuchung der gradientengereinigten Virussuspension**

Als Antigen für die immunologischen Tests wurde PsHV verwendet. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden mittels Negativkontrastierung Herpesviren mit ihrer typischen Morphologie (Durchmesser von 120 – 200 nm, ikosaedrisches Nukleokapsid) nachgewiesen. Der Proteingehalt lag bei der ersten Aufreinigung bei 1.71 mg/ml, bei der zweiten Aufreinigung bei 1.03 mg/ml.



**Abbildung 11 und 12**

***Elektronenmikroskopische Darstellung mehrerer Partikel der Viruspräparation im Negativkontrast, Vergrößerung 1: 200 000 (Abb. 11) und 1 : 90 000 (Abb. 12): 120 – 200 nm Durchmesser, Partikel teilweise mit Kontrastmittel durchsetzt, ikosaedrisches Nukleokapsid***

### **4.3 Nachweis PsHV-spezifischer Antikörper im ELISA und Western Blot**

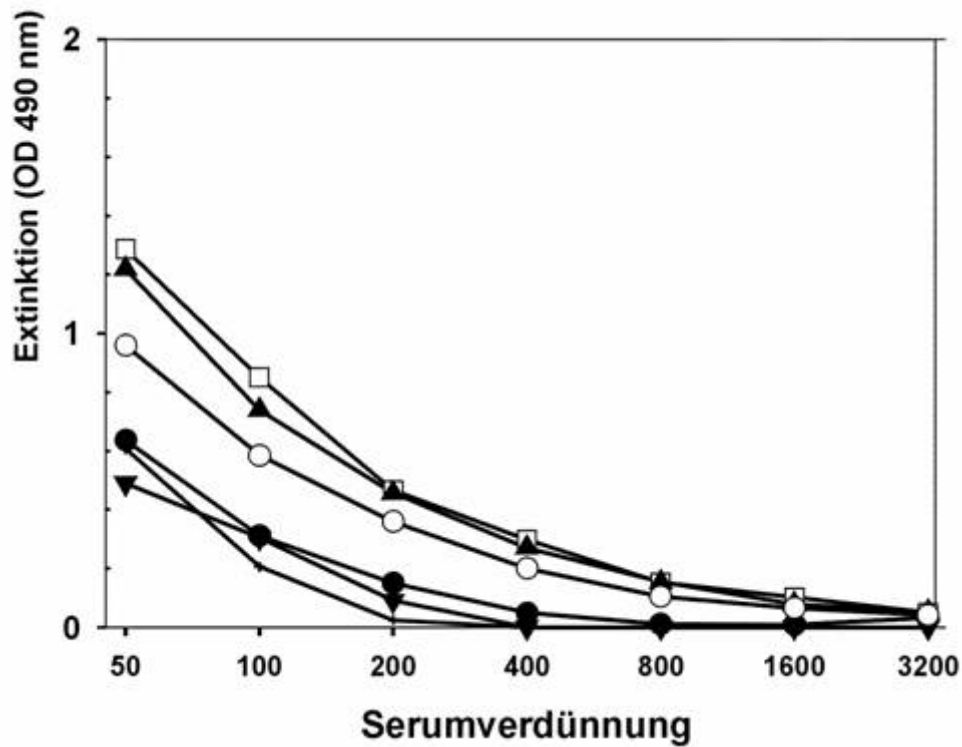
#### **4.3.1 Festlegung geeigneter Antigen- und Serumkonzentrationen**

Zur Überprüfung der Eignung des Hyperimmunserums für den ELISA wurden verschiedene Positiv- und Negativreferenzseren aus dem Neutralisationstest im ELISA getestet. Bei diesen Referenzseren waren im Serumneutralisationstest PsHV-Antikörper nachgewiesen worden. Von diesen Positivseren aus dem Serumneutralisationstest reagierten 9 Seren im ELISA ebenfalls positiv. Alle 4 Negativ-Referenzseren reagierten ELISA-negativ.

Zur Ermittlung des optimalen Gehalts an Antigen für die Beschichtung der Vertiefungen wurde in einem Vorversuch die Antigenkonzentration ermittelt. Dazu wurde in einem ELISA die Platte mit unterschiedlichen Antigenkonzentrationen (5, 10 und 20 µg/ml) beschichtet (50 µl pro Vertiefung) und jede Konzentration mit verschiedenen Verdünnungen (1:50 bis 1: 3200 in einer Zweiverdünnungsreihe) der zehn Positiv-Referenzseren getestet.

Bei einer Antigenkonzentration von 10 µg/ml, also 0.5 µg pro Vertiefung trat eine Sättigung ein, so dass die Extinktionswerte bei Verdopplung der Antigenkonzentration nicht mehr nennenswert anstiegen (siehe Abbildung 13). Um den Antigenverbrauch so gering wie möglich zu halten, wurde daher für den ELISA die mittlere Verdünnungsstufe, also 10 µg/ml, gewählt. Ab einer Serumverdünnung von 1:200 war bei einigen Positivseren keine deutliche Abweichung des Extinktionswertes von der Konjugatkontrolle mehr feststellbar. Die eindeutigsten Ergebnisse wurden bei einer Serumverdünnung von 1:50 erzielt. Daher wurde diese Verdünnung für den ELISA bevorzugt.

Die gemessenen Extinktionswerte der Positivseren nach Abzug der Konjugatkontrolle lagen zwischen 0.30 und 2.00. Alle Werte, die über 1.00 lagen, wurden als „+ +“, also stark positiv eingestuft.



**Abbildung 13**

**Extinktion bei verschiedenen Antigen- und Serumkonzentrationen im ELISA**

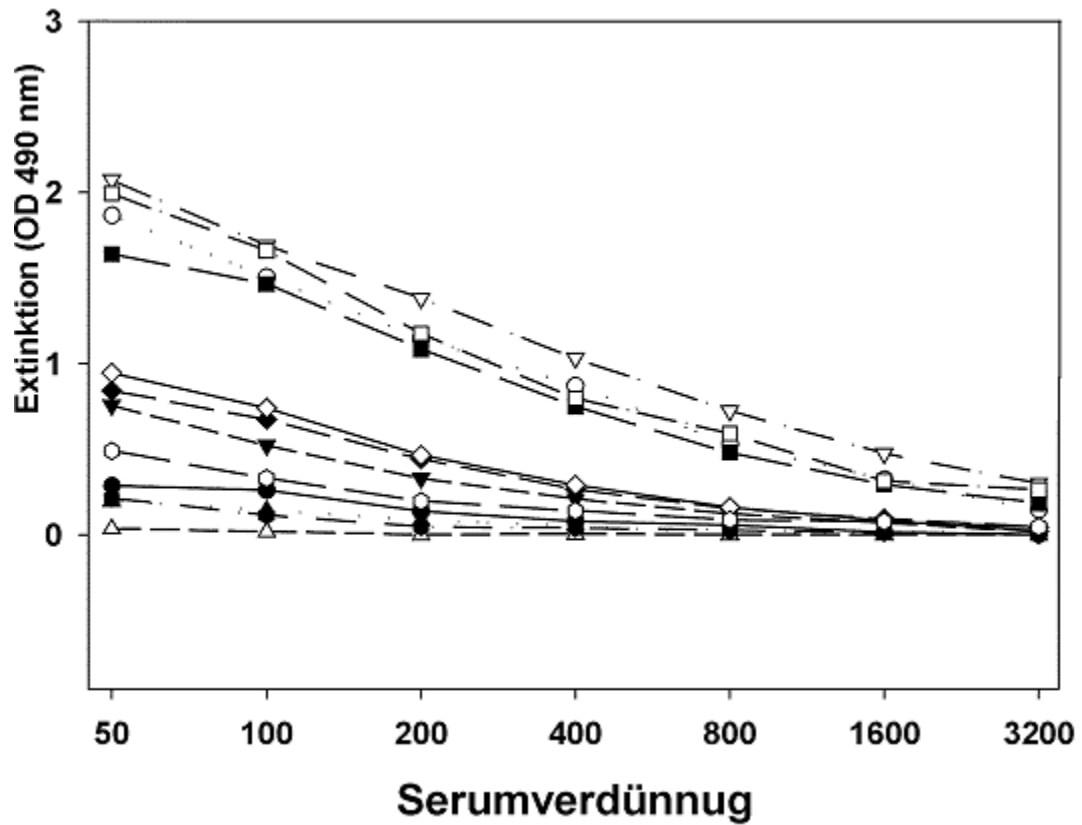
Die Kurven der Antigenkonzentration 10 µg/ml und 20 µg/ml verlaufen beinahe identisch, was auf eine Sättigung der Vertiefungen der ELISA-Platte mit Antigen hinweist.

Ara (Positiv-Referenzserum):

20 µg/ml ( □ ), 10 µg/ml ( ▲ ), 5 µg/ml ( ○ )

Graupapagei (Positiv-Referenzserum):

20 µg/ml ( ● ), 10 µg/ml ( + ), 5 µg/ml ( ▼ )



**Abbildung 14**

***Extinktion bei verschiedenen Serumkonzentrationen im ELISA***

*Kaum Abweichung der Extinktion der einfach positiven Seren von Negativseren und Konjugatkontrolle ab einer Verdünnung von 1:200.*

*Serum D ( $\nabla$ ), B ( $\circ$ ), F ( $\square$ ), E ( $\blacksquare$ ), H ( $\diamond$ ), G ( $\blacklozenge$ ): ELISA und Western Blot positiv*

*Serum C ( $\blacktriangledown$ ): ELISA positiv, Western Blot negativ*

*Serum L ( $\diamond$ ), K ( $\bullet$ ), I ( $\blacktriangle$ ), J ( $\triangle$ ): ELISA und Western Blot negativ*

### **4.3.2 Etablierung des Western Blot als Methode zur Überprüfung der ELISA-Ergebnisse**

#### 4.3.2.1 Auswahl und Titration von Antigen und Seren

Zur Ermittlung der optimalen Antigenkonzentration wurde eine Titration mit unterschiedlichen PsHV-Verdünnungsstufen durchgeführt. Bei einer PsHV-Konzentration von 0.17 mg/ml waren scharfe Banden ohne Überlagerung erkennbar. Daher wurde diese Konzentration für den Western Blot gewählt, wobei pro Gel 300 µl der verdünnten Virussuspension eingesetzt wurden. Dies entspricht pro Streifen Nitrozellulose einem Antigengehalt von 1.7 µg. Als Positivkontrollserum diente gegen PsHV gerichtetes Kaninchen-Hyperimmunserum, das zur Kontrolle der Virusspezifität der gebundenen Immunglobuline aus den zu testenden Psittazidenseren eingesetzt wurde.

Auch die optimale Konzentration des Positiv-Kontrollserums und der Psittazidenseren wurden in Titrationsreihen ermittelt. Die besten Ergebnisse mit scharf begrenzten Banden wurden bei einer Verdünnung der Psittazidenseren von 1:2000 und des Positiv-Kontrollserums von 1:10 000 bei einer Belichtungszeit von 10-30 Sekunden erzielt. Von 10 Positivseren aus dem Serumneutralisationstest reagierten 8 Seren im Western Blot ebenfalls positiv. Ein Serum, das im ELISA negativ reagiert hatte sowie ein weiteres, ELISA-positives Serum, reagierten im Western Blot negativ.

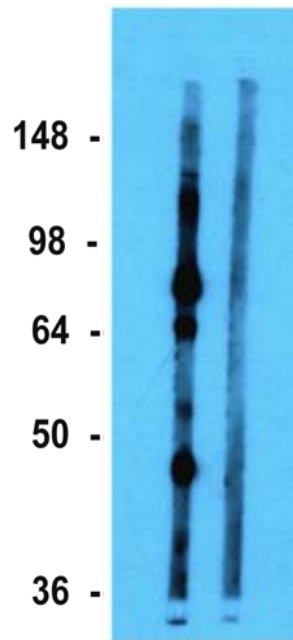
#### 4.3.2.2 Virusblockierungsversuch

Das Bandenspektrum der Positivseren aus dem Neutralisationstest stimmte mit dem Bandenmuster des Kaninchenhyperimmunserums überein. Zum Nachweis der Virusspezifität der Banden wurde ein Virusblockierungsversuch durchgeführt. Dabei wurden zwei Streifen der PsHV-Nitrozellulose mit Positivserum (gegen PsHV gerichtetes Kaninchen-Hyperimmunserum) inkubiert. Ein Streifen wurde anschließend mit PsHV aus der HEF-Zellkultur inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde wie oben beschrieben der Western Blot durchgeführt. Beim ersten Streifen (Positivserum ohne Virusblockierung) war das breite Spektrum an virusspezifischen Banden erkennbar,

während beim Streifen mit Virusblockierung keine Bande erkannt wurde, was die Virusspezifität der Bindungsreaktion beweist.

**Abbildung 15**

***Virusblockierungsversuch***

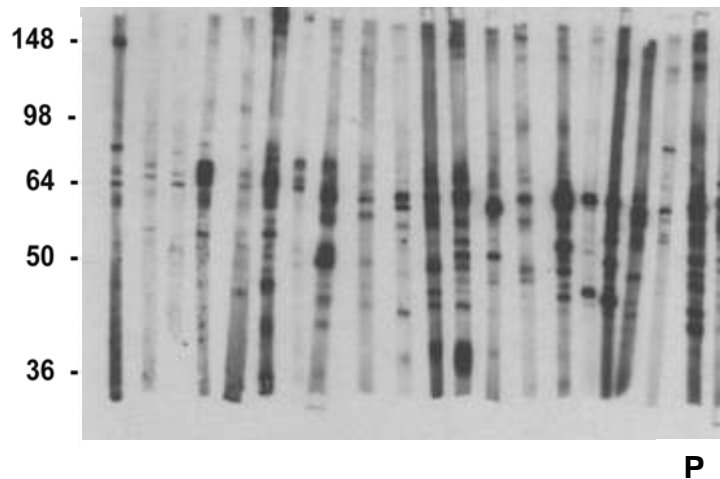


*Links: Positivserum ohne Virusblockierung mit virusspezifischen Banden*

*Rechts: Nach Virusblockierung – keine Banden erkennbar*

### 4.3.3 Bandenspektrum der virusspezifischen Proteine und Molekulargewicht der hauptimmunogenen Banden

Die verschiedenen Positivseren zeigten ein breites Spektrum unterschiedlicher Banden, die in vielfältiger Weise angeordnet waren.

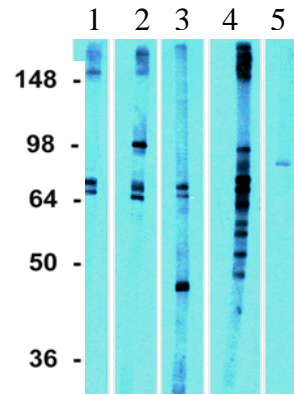


#### Abbildung 16

*Western Blot mit gegen PsHV gerichtetem Kaninchenhyperimmunserum als Positivkontrolle (P) und Patientenseren von Psittaziden, die im ELISA positiv getestet wurden.*

Einige dieser Banden wurden bei einer Vielzahl der Positivseren erkannt. Dazu gehören insbesondere vier Proteine, die daher als hauptimmunogene Proteine bezeichnet wurden. Ihr Molekulargewicht wurde mittels eines Proteinstandardmarkers ermittelt und lag bei 44, 64, 70 und 98 kD. Die Häufigkeit, mit der diese erkannt wurden, wurde nochmals spezifisch untersucht.



**Abbildung 17****Beispiele für typische  
Bandenspektren bei PsHV**

1= Doppelbande (64/70 kD)

2 = Doppelbande und obere hauptimmunogene Bande ( 98 kD)

3 = Doppelbande und untere hauptimmunogene Bande ( 44 kD)

4 = breites Spektrum PsHV-spezifischer Banden (Positiv-Kontrollserum)

5 = Serum ohne PsHV-Antikörper

Die nachfolgende Tabelle zeigt auf, wie häufig diese hauptimmunogenen Banden im Western Blot erkannt wurden. Die Verteilung der Banden, die erkannt wurden, ist sehr variabel. Während beispielsweise in Bestand Nr. 1 in 13 Fällen nur die Doppelbande bei 64 und 70 kD erkannt wurde, war diese Anordnung in anderen Beständen kaum zu finden. Am häufigsten wurden die Doppelbande bei 64 und 70 kD, eine „obere“ Bande bei 98 kD, sowie eine „untere“ Bande bei 44 kD erkannt. In mehreren Beständen fand sich in vielen Fällen die Verteilung Doppelbande mit oberer und unterer Hauptbande zuzüglich weiterer Banden oder die Doppelbande mit einem wahllosen Muster zahlreicher weiterer virusspezifischer Banden. Eine Gesetzmäßigkeit bezüglich der Frische der Infektion und dem Muster der erkannten Virusproteine ließ sich nicht ableiten.

**Tabelle 2**

**Verteilungsmuster der virusspezifischen Banden innerhalb der einzelnen Bestände**

	Bestandsnummer													
	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	
Keine Bande	<b>6</b>	1	0	1	2	0	1	1	0	0	0	1	0	
Eine Bande	<b>6</b>	4	0	1	2	2	1	3	0	2	3	0	2	
Doppelbande (64 / 70 kD)	<b>13</b>	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Doppelbande(64/70 kD) + untere (44 kD) Hauptbande	5	5	0	0	0	0	<b>6</b>	0	0	2	0	0	3	
Doppelbande(64/70 kD) + untere (44 kD) Hauptbande + weitere	<b>14</b>	3	1	3	0	0	0	4	2	2	<b>7</b>	3	4	
Doppelbande(64/70 kD) + obere (98 kD) Hauptbande	0	4	0	0	1	2	4	1	0	2	5	0	2	
Doppelbande(64/70 kD) + obere (98 kD) Hauptbande + weitere	0	1	0	3	2	3	1	2	1	1	3	1	<b>7</b>	
Doppelbande(64/70 kD) + untere(44 kD) + obere (98 kD) Hauptbande	2	2	1	0	1	2	2	1	2	0	3	0	0	
Doppelbande + untere (44 kD) + obere(98 kD) Hauptbande + weitere	2	<b>14</b>	1	3	0	3	1	<b>13</b>	5	2	<b>19</b>	2	<b>26</b>	
Doppelbande (64/70kD) + sonstige Banden	<b>11</b>	0	0	<b>8</b>	1	<b>8</b>	3	1	0	4	<b>7</b>	0	2	
Sonstige Banden	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	

Fettdruck: Mehr als 5 Seren

#### **4.3.4 Aufgliederung der ELISA-Ergebnisse nach Stärke der Farbreaktion (Extinktion)**

Bei der Untersuchung der Seren aus den Beständen wurde als erstes die Verteilung der Seren und die Zuverlässigkeit des PsHV-ELISA analysiert (siehe Tabelle 2). Dabei reagierten bei einer Gesamtzahl von 750 getesteten Seren 190 Seren einfach und 100 Seren zweifach positiv. Das entspricht einem Anteil von 25.3 bzw. 13.3 %. Alle im ELISA stark positiven Seren reagierten ausnahmslos im Western Blot ebenfalls positiv.

Der Anteil zweifach positiver Seren an der Gesamtzahl ELISA-positiver Seren lag bei 34.5 %, das heißt etwa ein Drittel aller ELISA-positiven Seren reagierte stark positiv und wurde im Western Blot zu 100 % bestätigt.

23 Seren, also 12.1 % der ELISA-positiven Seren, reagierten im Western Blot negativ und sind daher im ELISA falsch-positiv getestet. Bei der Auswertung der einzelnen Bestände ist erkennbar, dass in einigen Beständen der Anteil falsch positiver ELISA-Ergebnisse weit über dem Durchschnitt liegt, zum Beispiel bei Bestand Nr. 5 und 9, wo nur etwa ein Drittel bzw. die Hälfte aller einfach positiven ELISA-Ergebnisse im Western Blot bestätigt wurden.

**Tabelle 3****ELISA-Ergebnisse bei Bestandsuntersuchungen:**

Getestete Population	Gesamtzahl der Seren	ELISA +	Im Western Blot bestätigt	ELISA ++	Im Western Blot bestätigt	ELISA negativ
Bestand 1	59	32 (54.2 %)	32 (100 %)	1 (1.7 %)	1 (100 %)	26 (44.1 %)
Bestand 2	61	22 (36.1 %)	20 (90.9 %)	10 (16.4 %)	10 (100 %)	29 (47.5 %)
Bestand 3	16	2 (12.5 %)	2 (100 %)	2 (12.5 %)	2 (100 %)	12 (75.0 %)
Bestand 4	92	16 (17.4 %)	15 (93.8 %)	2 (2.2 %)	2 (100 %)	74 (80.4 %)
Bestand 5	37	6 (16.2 %)	2 (33.3 %)	3 (8.1 %)	3 (100 %)	28 (75.7 %)
Bestand 6	44	17 (38.6 %)	15 (88.2 %)	4 (9.1 %)	4 (100 %)	23 (52.3 %)
Bestand 7	44	0 (0 %)	0	0 (0 %)	0	44 (100 %)
Bestand 8	44	11 (25.0 %)	9 (81.8 %)	9 (20.5 %)	9 (100 %)	24 (54.6 %)
Bestand 9	45	8 (17.8 %)	4 (50.0 %)	18 (40.0 %)	18 (100 %)	19 (42.2 %)
Bestand 10	40	7 (17.5 %)	7 (100 %)	3 (7.5 %)	3 (100 %)	30 (75.0 %)
Bestand 11	41	12 (29.3 %)	9 (75.0 %)	4 (9.8 %)	4 (100 %)	25 (61.0 %)
Bestand 12	84	33 (39.3 %)	30 (90.9 %)	14 (16.7 %)	14 (100 %)	37 (44.1 %)
Bestand 13	42	5 (11.9 %)	4 (80.0 %)	2 (4.8 %)	2 (100 %)	35 (83.3 %)
Bestand 14	101	19 (18.8 %)	17 (89.5 %)	28 (27.7 %)	28 (100 %)	54 (53.5 %)
<b>Gesamt:</b>	<b>750</b>	<b>190 (25.3 %)</b>	<b>166 (87.4 %)</b>	<b>100 (13.3 %)</b>	<b>100 (100 %)</b>	<b>460 (61.3 %)</b>

Bei den Einzeleren reagierten bei einer Gesamtzahl von 328 getesteten Seren 56 Seren (17.1 %) einfach und 18 Seren (5.5 %) zweifach positiv. Auch hier reagierten alle im ELISA zweifach positiven Seren im Western Blot ebenfalls positiv, das heißt etwa ein Viertel (24.3 %) aller ELISA-positiven Einzeleren reagierten zweifach positiv und wurde auch hier im Western Blot zu 100 % bestätigt. Acht Seren, also 14.3 % der positiv getesteten Seren bei Einzeltieruntersuchungen, reagierten im Western Blot negativ.

**Tabelle 4****ELISA-Ergebnisse bei Einzeltieruntersuchungen:**

Getestete Einzelseren	Gesamtzahl der Seren	ELISA +	Im Western Blot bestätigt	ELISA ++	Im Western Blot bestätigt	ELISA negativ
Psittaziden mit Pacheco-Verdacht	30	5 (16.7 %)	3 (60.0 %)	7 (23.3 %)	7 (100 %)	18 (60.0 %)
Psittaziden ohne Pacheco-Verdacht	298	51 (17.1 %)	45 (88.2 %)	11 (3.7 %)	11 (100 %)	236 (79.2 %)
<b>Gesamtzahl</b>	<b>328</b>	<b>56 (17.1 %)</b>	<b>48 (85.7 %)</b>	<b>18 (5.5 %)</b>	<b>18 (100 %)</b>	<b>254 (77.4 %)</b>

Der Anteil der stark-positiven Seren, die im ELISA zu 100% richtig-positiv reagierten, lag also je nach untersuchter Gruppe (Einzeltiere oder Bestände) etwa bei einem Viertel bis einem Drittel aller positiv-getesteten Seren.

**4.3.5 Auswertung bezüglich Seroprävalenz**

Für die Untersuchung der Seroprävalenz standen 298 Seren von Einzeltieren ohne klinischen Pachecoverdacht zur Verfügung. Diese Seren stammten überwiegend aus der Klinik des Instituts bzw. von Kollegen. Im Vorbericht gab es weder Hinweise auf klinische Symptome der Pachecoschen Krankheit noch auf eine Exposition zu an Pacheco erkrankten Psittaziden. Bei 56 von 298 Vögeln waren PsHV-Antikörper nachweisbar, was einer Seroprävalenz von 18.8 % entspricht.

Bei 30 Seren von Einzeltieren, die Kontakt zu PsHV-erkrankten Psittaziden hatten oder klinische Symptome aufwiesen, die auf eine PsHV-Infektion hindeuteten, wurde eine Seroprävalenz von 33.3 % ermittelt, es reagierten also 10 der 30 Seren im Western Blot positiv.

**Tabelle 5****Seroprävalenz von PsHV-Antikörpern bei Einzeltieruntersuchungen:**

	Gesamtzahl	Seropositive Tiere	Seroprävalenz
Seren von Psittaziden mit Pacheco-Verdacht	30	10	<b>33.3 %</b>
Seren von Psittaziden ohne Pacheco-Verdacht	298	56	<b>18.8%</b>
<b>Gesamtsumme getesteter Seren</b>	<b>328</b>	<b>66</b>	<b>20.1 %</b>

Bei 750 Seren von klinisch gesunden Tiere aus Bestandsroutineuntersuchungen (14 verschiedenen Bestände mit 16 bis 92 Tieren) lag die durchschnittliche Seroprävalenz, also der Anteil der im Western Blot bestätigten seropositiven Vögel, bei 37.3 %. Der Anteil variierte je nach untersuchtem Bestand von 0 % (ein komplett seronegativer Bestand) bis zu 79.7 % bei Bestand Nr. 1. Bei Bestand Nr.1 handelt es sich um Seren aus einer frisch importierten Gruppe von Amazonen, die noch in der Quarantäne getestet wurden. Auch bei diesen Vögeln waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine klinischen Symptome vorhanden.

**Tabelle 6****Seroprävalenz von PsHV-Antikörpern bei Bestandsuntersuchungen:**

<b>Getestete Population</b>	<b>Gesamtzahl der Seren</b>	<b>Seropositive Seren</b>	<b>Seroprävalenz</b>
Bestand 1	59	47	79.7 %
Bestand 2	61	30	49.2 %
Bestand 3	16	4	25.0 %
Bestand 4	92	17	18.5 %
Bestand 5	37	5	13.5 %
Bestand 6	44	19	43.2 %
Bestand 7	44	0	0.0 %
Bestand 8	44	18	40.9 %
Bestand 9	45	22	48.9 %
Bestand 10	40	10	25.0 %
Bestand 11	41	13	31.7 %
Bestand 12	84	44	52.4 %
Bestand 13	42	6	14.3 %
Bestand 14	101	45	44.6 %
<b>Gesamt:</b>	<b>750</b>	<b>280</b>	<b>37.3 %</b>

Die durchschnittliche Seroprävalenz aller 1078 untersuchten Seren betrug 32.1 %.

#### 4.3.6 Speziesdifferenzierung bezüglich Seroprävalenz

Die ermittelten Ergebnisse wurden nach verschiedenen Spezies aufgeschlüsselt, um festzustellen, ob bezüglich der Infektion mit PsHV eine Prädisposition erkennbar ist. Die untersuchten Seren wurden nach folgenden Gruppen untergliedert: Graupapageien, Aras, Amazonen, Kakadus, Edelpapageien und „Sonstige“ (umfasst großen und kleinen Vasapapagei, Grünstülpapagei, Amboina-Königssittich, Blaunackenpapagei und Sonnensittich).

Relevant für die Beurteilung sind vor allem gemischte Bestände, in denen mindestens 3 verschiedene (ohne „sonstige“) der oben zusammengefassten Gruppen von Psittazidenspezies vorkommen, also Bestand-Nr. 2, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13. Innerhalb dieser gemischten Bestände wurden für die Beurteilung insbesondere Gruppen mit mehr als 15 Tieren herangezogen, um eine repräsentative Aussage treffen zu können. Analog wurde bei der Auswertung der Seren von Einzeltieren verfahren. Die Resultate dieser Aufgliederung sind in Tabelle 7 und 8 zusammengefasst. Sie zeigen, dass bezüglich der Infektion mit PsHV alle getesteten Spezies empfänglich sind. Trotz Schwankungen zwischen den einzelnen Beständen ist keine Prädisposition erkennbar. So scheint zum Beispiel in Bestand Nr. 4 (Tabelle 7) eine geringere Infektionsempfänglichkeit bei Kakadus (nur 9.8 % Seropositive im Vergleich zu 36.4 % bei Graupapageien und 42.9 % bei Aras) vorzuliegen. Die Untersuchung von Bestand Nr. 12 mit 65.5 % seropositiven Kakadus widerlegt dies aber wieder. Die Seroprävalenz in den untersuchten Gruppen mit mehr als 15 Tieren entspricht in etwa der durchschnittlichen Prävalenz im gesamten Bestand. Auch bei der Auswertung der Seren von Einzeltieren (Tabelle 7) ist eine weitgehend einheitliche Verteilung der Seroprävalenz von 11.1 bis 23.3 % zwischen den einzelnen Gruppierungen mit mehr als 15 Tieren erkennbar.



**Tabelle 7****Untersuchung auf Speziesprädisposition bei Beständen:****Anteil der PsHV-seropositiven Tiere**

Population	Graupapageien	Edelpapageien	Aras	Kakadus	Amazonen	Sonstige
Bestand 1	---	---	---	---	<b>47 / 59 (79.7 %)</b>	---
Bestand 2	5 / 9 (55.6 %)	3/10 (30.0 %)	---	---	<b>12 / 26 (46.2 %)</b>	<b>10 / 16 (62.5 %)</b>
Bestand 3	1 / 9 (11.1 %)	2 / 6 (33.3 %)	---	---	---	1 / 1 (100 %)
Bestand 4	<b>8 / 22 (36.4 %)</b>	0 / 2 (0 %)	3 / 7 (42.9 %)	<b>6 / 61 (9.8 %)</b>	---	---
Bestand 5	0 / 7 (0 %)	2 / 14 (14.3 %)	---	---	---	<b>3 / 16 (18.8 %)</b>
Bestand 6	0 / 8 (0 %)	---	<b>12 / 22 (54.6 %)</b>	---	7 / 14 (50.0 %)	---
Bestand 7	<b>0 / 21 (0 %)</b>	---	0 / 9 (0 %)	0 / 11 (0 %)	0 / 1 (0 %)	0 / 2 (0 %)
Bestand 8	---	<b>7 / 17 (41.2 %)</b>	5 / 9 (55.6 %)	---	---	<b>6 / 18 (33.3 %)</b>
Bestand 9	<b>22 / 45 (48.9 %)</b>	---	---	---	---	---
Bestand 10	1 / 11 (9.1 %)	<b>5 / 20 (25.0 %)</b>	---	4 / 9 (44.4 %)	---	---
Bestand 11	0 / 6 (0 %)	---	---	0 / 2 (0 %)	<b>7 / 21 (33.3 %)</b>	6 / 12 (50.0 %)
Bestand 12	<b>6 / 15 (40.0 %)</b>	<b>13 / 27 (48.2 %)</b>	---	<b>19 / 29 (65.5 %)</b>	---	6 / 13 (46.2 %)
Bestand 13	<b>2 / 27 (7.4 %)</b>	0 / 1 (0 %)	4 / 12 (33.3 %)	---	0 / 2 (0 %)	---
Bestand 14	---	<b>16 / 42 (38.1 %)</b>	---	---	---	<b>29 / 59 (49.15 %)</b>
<b>Summe</b>	<b>45 / 180 (25.0 %)</b>	<b>48 / 139 (34.5 %)</b>	<b>24 / 59 (40.7 %)</b>	<b>29 / 112 (25.9 %)</b>	<b>73 / 123 (59.4 %)</b>	<b>61 / 137 (44.5 %)</b>

**Fett hervorgehoben: Gruppen mit mindestens 15 Tieren**

**Tabelle 8****Untersuchung auf Speziesprädisposition bei Seren von Einzeltieren:****Anteil der PshV-seropositiven Tiere**

<b>Population</b>	<b>Graupapageien</b>	<b>Edelpapageien</b>	<b>Aras</b>	<b>Kakadus</b>	<b>Amazonen</b>	<b>Sonstige</b>
<b>Einzeltiere mit Pacheco-Verdacht</b>	1 / 7 (14.3 %)	---	6 / 8 (75.0 %)	0 / 4 (0 %)	1 / 8 (12.5 %)	2 / 3 (66.7 %)
<b>Einzeltiere ohne Pacheco-Verdacht</b>	<b>18 / 105 (17.1 %)</b>	3 / 5 (60.0 %)	<b>4 / 27 (14.8 %)</b>	<b>3 / 27 (11.1 %)</b>	<b>28 / 120 (23.3 %)</b>	0 / 14 (0 %)
<b>Summe</b>	<b>19 / 112 (17.0 %)</b>	<b>3 / 5 (60.0 %)</b>	<b>10 / 35 (28.6 %)</b>	<b>3 / 31 (9.7 %)</b>	<b>29 / 128 (22.7 %)</b>	<b>2 / 17 (11.8 %)</b>

**Fett hervorgehoben: Gruppen mit mindestens 15 Tieren**

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Kreuzreaktivität des Hyperimmunserums im SDS-PAGE und Western Blot

In der vorgestellten Arbeit wurde die Kreuzreaktivität eines gegen Tauben-IgY gerichteten Kaninchenhyperimmunserums im Western Blot gegen 55 Spezies aus 9 Ordnungen getestet. Dabei wurde bei 48 Spezies aus 7 Ordnungen eine IgY-spezifische Reaktion nachgewiesen. Die Ergebnisse stimmten prinzipiell mit den Befunden von Baxendale und Kollegen überein, die eine Reaktivität von anti-Tauben-Serum und anti-Hühnerserum mit Serumproteinen von Fasan, Huhn, Ente, Pute, Taube und Spatz (*Passer domesticus*) nachweisen konnten (BAXENDALE et al. 1971). Durch die in der vorgestellten Untersuchung gewählte Methode des Western Blots konnte darüber hinaus die Kreuzreaktivität spezifisch für das IgY der verschiedenen Spezies demonstriert werden. Auffallend war dabei die ausgeprägte Kreuzreaktivität mit Vertretern der Ordnung Psittaciformes. Dass das IgY von Vertretern dieser Ordnung prinzipiell Kreuzreaktivität aufweist, war durch Studien mit einem Nymphensittich-IgY-spezifischen Kaninchen-Hyperimmunserum bekannt (BAGHIAN et al. 1999). Das Nymphensittich-IgY-spezifischen Kaninchen-Hyperimmunserum wies eine Reaktivität mit Seren von Graupapageien, Kakadus, Edelpapageien, Aras und Amazonen auf. Eine Reaktivität mit dem IgY von Graupapageien, Kakadus, Edelpapageien, Aras und Amazonen konnte auch mit dem Tauben-IgY-spezifischen Hyperimmunserum erzielt werden. Eine Kreuzreaktivität mit dem Nymphensittich-IgY fehlte allerdings bzw. war im Falle des Wellensittich-IgY nur sehr schwach ausgeprägt. Hinweise auf unterschiedliche Stärke der Kreuzreaktion ergeben sich auch bei anderen Spezies als dem Wellensittich. So waren zum Beispiel bei den getesteten Rosakakadus und Goldbauchamazonen deutlich längere Belichtungszeiten zur Darstellung beider IgY-Ketten nötig als bei anderen Kakadu- bzw. Amazonenspezies im Test. Allerdings wurden für die vorgestellten Untersuchungen Vollseren eingesetzt. Daher ist nicht auszuschließen, dass die festgestellten Unterschiede in der Reaktivität auf speziesspezifische bzw. individuelle Unterschiede im IgY-Gehalt des Serums zurückzuführen sind. Bei Einsatz des gegen Tauben-IgY gerichteten Hyperimmunserums im ELISA ist eine unterschiedliche Stärke der Reaktivität mit den verschiedenen Spezies zu berücksichtigen, so dass quantitative Vergleiche der Reaktion aufgrund der Extinktion nicht statthaft sind.

## 5.2 Abweichungen der Untersuchungsergebnisse in Abhängigkeit vom jeweiligen Testverfahren

Die Eignung des Hyperimmunserums als Brückenantikörper in immunvermittelten Testen konnte in dieser Arbeit dargestellt werden. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus der Tatsache, dass mittels ELISA und Western Blot PsHV-spezifische Antikörper nachweisbar waren. Dabei zeigten initiale Untersuchungen von im Neutralisationstest positiven Seren auch im PsHV-ELISA eine verdünnungsabhängige Reaktion. Als Bestätigungstest wurde im Rahmen dieser Arbeit ein PsHV-Western-Blot etabliert. Aufgrund seiner Spezifität hat sich dieser Test in der humanen Virusserodiagnostik, wie bei der humanen Immundefizienzvirus-Diagnostik bewährt (DI MARZO VERONESE et al. 1992). Dabei werden die nach Grösse aufgetrennten Proteine auf einer festen Phase präsentiert, so dass der Nachweis einer spezifischen Reaktion mit den einzelnen viralen Proteinen möglich ist (TIJSSEN 1985). Im Fall des PsHV-Western Blots wurden insbesondere eine Doppelbande bei 64 und 70 kD erkannt, sowie Proteine mit einem Molekulargewicht von 98 kD und 44 kD.

Der Vergleich des ELISA und Western Blot zeigte bei im ELISA stark positiven Reaktionen zu 100 % Übereinstimmung. Demgegenüber war bei 12.1 % der im PsHV-ELISA schwach positiven Seren keine virusspezifische Reaktion nachweisbar. Diese Reaktionen sind daher als falsch positiv einzustufen. Die Problematik unspezifischer Reaktionen im ELISA wurde bereits bei anderen Autoren (YORK et al. 1982) beschrieben und tritt insbesondere bei niedrigen Serumverdünnungen auf. Dabei treten falsch positive ELISA-Ergebnisse gehäuft bei einer minderwertigen Qualität von Seren auf, die durch Hämolyse oder bakterielle Kontamination bedingt sein kann. Verstärkt werden diese Effekte durch unsachgemäßen Transport mit mangelhafter Kühlung. Daher wurde der Western Blot routinemäßig als Bestätigungstest eingesetzt.

### 5.3 Seroprävalenz von PsHV-Antikörpern bei den untersuchten Populationen

Die in dieser Arbeit ermittelte Seroprävalenz von PsHV-Antikörpern lag je nach untersuchter Population zwischen 18.8 % (Einzeltiere ohne Pacheco-Vorgeschichte) und 37.3 % (Bestandsuntersuchungen). Ein Bestand von Amazonen in Importquarantäne wies eine Seroprävalenz von 79.7 % auf. Mit Ausnahme eines Bestandes gab es bei den 13 anderen untersuchten Beständen Tiere mit Antikörpern gegen PsHV. Selbst in der Gruppe der Einzeltiere, die zum Teil über viele Jahre ohne Kontakt zu anderen Psittaziden lebten, betrug die Seroprävalenz von PsHV-Antikörpern durchschnittlich 20.1 %.

Die Arbeit demonstriert damit eindrücklich die Häufigkeit einer subklinischen PsHV-Infektion mit der Gefahr latenter Virusträger. Während frühere Untersuchungen von einem meist akuten Krankheitsverlauf nach PsHV-Infektion ausgingen (SIMPSON und HANLEY 1976, EHRSAM et al. 1978, HIRAI et al. 1978), bestätigen die serologischen Ergebnisse Hinweise aus der PCR-Diagnostik, die latent infizierte Psittaziden detektierte (PHALEN et al. 2001). Der Anteil seropositiver Einzeltiere ohne klinische Symptome oder Kontakt zu erkrankten Vögeln deutet dabei auf eine lang anhaltende Persistenz der Erreger im Organismus hin. Dies steht im Einklang mit Beschreibungen von akuten Pacheco-Ausbrüchen in alteingesessenen geschlossenen Beständen ohne Eingliederung neuer Tiere (PANIGRAHY und GRUMBLES 1983, CARTWRIGHT et al. 1985, ESKENS et al. 1994). Analog zu anderen  $\alpha$ -Herpesvirusinfektionen ist daher auch bei PsHV von einer lang anhaltenden, möglicherweise lebenslangen Persistenz des Erregers auszugehen.

Die Tatsache, dass die höchste Seroprävalenz in Beständen frisch importierter Psittaziden ermittelt wurde, weist auf eine stressbedingte Reaktivierung und Virusausscheidung hin. Damit ist die Gefahr der Ansteckung und Erkrankung bei Psittaziden in Stress-Situationen wie z. B. Ausstellungen oder Importquarantäne als besonders hoch einzustufen.

Überraschend war der hohe Anteil seropositiver Tiere auch bei Spezies, von denen man bisher annahm, dass eine PsHV-Infektion in der Regel einen schweren bis tödlichen Verlauf nimmt (EHRSAM et al. 1978; KRAUTWALD et al. 1988; STEINKE

1998; KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS 1999). Dies mag zum Teil darauf beruhen, dass im Neutralisationstest, der bisher als konventionelles Verfahren für die PsHV-Serodiagnostik diente, falsch-negative Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher PsHV-Serotypen auftreten können. Im ELISA und Western Blot als Immunoassays werden demgegenüber gruppenspezifische Antigene erfasst. Durch die enzymatische Vervielfältigung des Signals wird bei diesen Verfahren zudem der Antikörpernachweis verstärkt, so dass auch schwach seropositive Tiere wie etwa persistent infizierte Vögel erfasst werden.

#### **5.4 Speziespezifische Unterschiede bezüglich der Seroprävalenz**

Die Aufgliederung der PsHV-seropositiv getesteten Psittaziden nach Spezies zeigt, dass PsHV-Infektionen bei allen untersuchten Arten auftreten. Antikörper waren sowohl bei südamerikanischen, als auch bei afrikanischen und australischen Psittaziden nachweisbar. Dies unterstreicht die weltweite Bedeutung der Erkrankung.

Im Hinblick auf den Anteil seropositiver Tiere waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gattungen und Arten erkennbar. Bezüglich der Infektionsempfänglichkeit scheinen daher alle Spezies gleichermaßen gefährdet zu sein, wohingegen Morbidität, Krankheitsverlauf und Mortalität nach einer Infektion zwischen den einzelnen Spezies stark variieren (EHRSAM et al. 1978; KRAUTWALD et al. 1988; STEINKE 1998; KALETA, KRAUTWALD-JUNGHANNS 1999).

#### **5.5 Bandenspektrum der viralen Proteine von PsHV**

Die Reaktionsmuster der Seren mit PsHV-Proteinen war sehr variabel. In einem Bestand reagierten 13 Seren nur mit der Doppelbande bei 64 und 70 kD, während diese Anordnung in anderen Beständen kaum zu finden war. Am häufigsten wurden die PsHV-Proteine bei 64 und 70 kD (Doppelbande), sowie PsHV-Proteine bei 98 kD und bei 44 kD (obere und untere Hauptbande) erkannt. In vielen Fällen fand sich auch die Verteilung Doppelbande mit oberer und unterer Hauptbande zuzüglich

weiterer Banden oder die Doppelbande mit einem wahllosen Muster zahlreicher weiterer PsHV-spezifischer Banden. Eine Gesetzmäßigkeit bezüglich der Frische der Infektion und dem Muster der erkannten Virusproteine ließ sich nicht ableiten, war aber auch nicht gänzlich auszuschließen, da bei vielen Seren keine Angaben über den möglichen Zeitpunkt der Infektion vorlagen.

### **5.6 Einsatzmöglichkeiten und Grenzen der vorgestellten Verfahren in der PsHV-Diagnostik**

Die vorliegende Arbeit zeigt zum Teil erhebliche Unterschiede in der Spezifität und Sensitivität der einzelnen Methoden auf. Im Gegensatz zum zeit- und materialaufwendigen Serumneutralisationstest ermöglicht der ELISA die zeitsparende Untersuchung einer großen Anzahl von Seren und erwies sich damit als Verfahren der Wahl für Bestandsroutineuntersuchungen.

Aufgrund der Erkennung gruppenspezifischer Antigene und der enzymatischen Aufschlüsselung der Antigenstruktur treten bei diesem Verfahren seltener falsch-negative Ergebnisse beispielsweise aufgrund unterschiedlicher Serotypen oder niedriger Antikörpertiter auf als beim Serumneutralisationstest, bei dem durch fehlende Kreuzreaktivität der einzelnen Serotypen untereinander Infektionen mit einem anderen Serotyp nicht erfasst werden. Für eine Serotypisierung und Charakterisierung von Subtypen sind die vorgestellten Immunoassays daher aber nicht geeignet.

Die Überprüfung positiver ELISA-Ergebnisse im Western Blot zeigte, dass insbesondere im einfach positiven Bereich unspezifische Reaktionen zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Daher sollten positive ELISA-Ergebnisse immer im Western Blot verifiziert werden.

Es gibt bisher keine Studien zum Zeitpunkt der Serokonversion nach natürlicher Infektion mit PsHV. Untersuchungen an Taubenherpes und Infektiöser Laryngotracheitis belegen, dass frühestens 4-5 Tage nach Infektion humorale Antikörper nachweisbar sind (SCHMIDT 1992). Geht man davon aus, dass die

Immunogenese bei PsHV ähnlich verläuft, sind die hier vorgestellten serologischen Verfahren zur Diagnostik bei perakuten und akuten Verlaufsformen der Pachecoschen Papageienkrankheit ungeeignet, da die Tiere dann häufig vor dem Nachweis humoraler Antikörper versterben. Aufgrund der serologischen Untersuchung ist auch keine Differenzierung zwischen einer latenten und einer (sub-) klinischen Infektion mit Virusausscheidung möglich. ELISA und Western Blot sind aber die Verfahren der Wahl, um schnell und kostengünstig eine große Anzahl von Seren zu untersuchen, wie es zum Beispiel bei Bestands-Routineuntersuchungen der Fall ist.

### **5.7 Anwendung der vorgestellten Immunoassays zur Bestandssanierung**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen mit durchschnittlich 37.3 % (Bestandsuntersuchungen) eine hohe Seroprävalenz von PsHV-Antikörpern in Psittazidenbeständen ohne klinische Anzeichen einer Pacheco-Erkrankung auf. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie verschiedene Studien auch mittels PCR (KRAUTWALD et al. 1988, PHALEN et al. 2001) deuten darauf hin, dass analog zu anderen  $\alpha$ -Herpesvirusinfektionen eine lang anhaltende, möglicherweise lebenslange Persistenz der Erreger im Organismus besteht. Da eine Reaktivierung der Virusausscheidung zum Beispiel durch ein Stressereignis bei latent infizierten Tieren jederzeit möglich ist, stellen diese Vögel eine permanente Gefahr für Kontakttiere dar. Bei einer durchschnittlichen Seroprävalenz von 32.1 % (Bestände und Einzeltiere) besteht bei der Integration neuer Psittaziden daher eine erhebliche Infektionsgefahr für die Psittaziden im Bestand. Um das Risiko eines Pacheco-Ausbruchs zu minimieren, besteht die Möglichkeit, neue Tiere vor der Eingliederung in den Bestand mit den vorgestellten sensitiven Verfahren auf PsHV-Antikörper zu testen. Die vorgestellten Methoden ermöglichen problemlos die Routineuntersuchung größerer Zahlen von Seren, mit dem Ziel, PsHV-positive Tiere von anderen zu trennen und langfristig PsHV-freie Bestände zu schaffen.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA und Western Blot als leistungsfähiges serologisch-immunologischen Nachweisverfahren für Psittazidenherpes etabliert. Die Durchführung des Immunoassays erfolgte mithilfe eines gegen Tauben-IgY gerichteten Hyperimmunserums, das als sekundärer Antikörper eingesetzt wurde. Vor der Anwendung im Immunoassay wurde die Kreuzreaktivität dieses Hyperimmunserums mit Immunglobulinen von 32 Psittazidenspezies sowie zahlreicher weiterer Spezies aus 7 Ordnungen der Klasse Aves nachgewiesen. Als Referenzverfahren wurde der Western Blot etabliert, mit dem der Nachweis virusspezifischer Proteine möglich ist.

Der in dieser Arbeit ermittelte Anteil PsHV-seropositiver Psittaziden lag je nach untersuchter Population zwischen 18.8 (Einzeltiere ohne Pacheco-Vorgeschichte) und 79.7 % (importierte Amazonen in Quarantäne). Im Durchschnitt betrug die Seroprävalenz bei den untersuchten Beständen 37.3 %, bei Einzeltieren 20.1 %. Bei Einzeltieren ohne klinische Symptome reagierten 18.8 % seropositiv, in der Gruppe mit klinischen Symptomen oder Exposition zu PsHV-erkrankten Tieren 33.3%. Mit Ausnahme eines Bestandes waren in allen der 14 untersuchten Bestände Tiere mit PsHV-Antikörpern nachzuweisen. Eine Prädisposition bestimmter Spezies war nicht erkennbar. PsHV-Antikörper konnten bei allen untersuchten Arten nachgewiesen werden, bei Psittaziden aus Südamerika, Afrika und Australien. Hohe Seroprävalenzen wurde bei Importtieren in Quarantäne festgestellt.

Die vorliegende Arbeit bestätigt Untersuchungen, die von einem erheblichen Prozentsatz latent PsHV-infizierter Psittaziden ausgehen. Geht man analog zu anderen Herpesvirusinfektionen von einer stressbedingten Reaktivierung mit Virusausscheidung aus, stellen diese Vögel eine permanente Gefährdung für Kontakttiere dar. Mithilfe der vorgestellten Immunoassays könnten prophylaktische Untersuchungen neuer Psittaziden vor der Integration und serologische Routineuntersuchungen von Beständen mit dem langfristigen Ziel PsHV-freier Bestände einfach und kostengünstig durchgeführt werden.

## 7 SUMMARY

### **Characterisation of cross-reactivity of pigeon-IgY-specific antiserum and use for Pacheco-serodiagnostics**

In the present study an ELISA and Western Blot were established as efficient immunological tests for psittacine herpesviruses serodiagnostics. A pigeon-IgY-specific antiserum was used as secondary antibody, that proved to cross-react with immunoglobulines of 32 psittacine species and with species of 7 orders of the class Aves.

Using the PsHV-ELISA for screening and Western Blot for confirmation the percentage of PsHV-seropositive Psittacines was ranging between 18.8 to 79.7% depending on the examined population, i.e. individual birds with no Pacheco history v.s. imported amazones during quarantine. In flocks the average PsHV-seroprevalence was 37.3% whereas in individual birds it was determined to be 20.1%. Within the group of "individual birds" 18.8% of birds without clinical symptoms and 33.3% of the birds with clinical symptoms or PsHV-exposure had PsHV-antibodies. Birds with PsHV-antibodies were detected in all but one of 14 tested flocks. A predisposition of certain psittacine species was not evident. PsHV-antibodies were found in all tested species including psittacines from South America, Africa and Australia. In particular high seroprevalences were detected in imported birds during quarantine.

The present analysis confirms suspected high percentage of latent PsHV-infected psittacines. With regard to recurrent reactivation of a PsHV-infection after stress, as known for other herpesviruses, PsHV-infected birds have to be considered a permanent thread to companion birds. The established immunoassays provide a feasible test regime to test psittacines before introducing to a new aviary or screen an entire flock in order to establish PsHV-free flocks.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. BAGHIAN A, REYES CV, MENDOZA A, TULLY T, KOUSOULAS KG. Production of a Rabbit Anti-Cockatiel Immunglobulin G and Characterisation of its Cross-Reactivities with Immunglobulin G of other Psittacine Species. *Avian Diseases* 1999;43:48-54.
2. BAUER B, LOHR JE, KALETA EF. Comparison of commercial ELISA test kits from Australia and the USA with the serum neutralisation test in cell cultures for the detection of antibodies to the infectious laryngotracheitis virus of chickens. *Avian Pathology* 1999;28:65-72.
3. BAXENDALE W, COURTENAY JS, PHILLIPS AW, ZOLA H. Some properties of pigeon and other avian serum proteins. *International Journal of Biochemistry* 1971;2:419-422.
4. BIGGS PM. The epidemiology of avian herpesviruses in veterinary medicine. *Develop. biol. Standard.* 1982;52:3-11.
5. CARTWRIGHT M, SPRAKER TR, McCLUGGAGE D. Psittacine inclusion body hepatitis in an aviary. *JAVMA* 1985;187(10):1045-1046.
6. CROMIE RL, BROWN MJ, FORBES NA, MORGAN J, STANFORD JL. A comparison and evaluation of techniques for diagnosis of avian tuberculosis in wildfowl. *Avian Pathology* 1993;22:617-630.
7. DAWSON GJ, ORSI VN, YATES VJ, CHANG PW, PRONOVOST AD. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian adenovirus and avian adenovirus-associated virus in chickens. *Avian Diseases* 1980;24:393-402.
8. DHARMA DN, SUDANA IG. Hepatic intranuclear Inclusion Bodies in a Cockatoo Bird. *Avian Diseases* 1982;27(1):301-304.

9. DI MARZO VERONESE F, LUSSO P, SCHÜPBACH J, GALLO RC. Human Retroviruses. In: Clinical virology manual. Eds.: Specter S, Lancz G. New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier 1992:585-626.
10. EHRSAM H, HAUSER B, METZLER A. Pachecos Papageienkrankheit – akuter Ausbruch in einem einheimischen Psittazidenbestand. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1978;120:23-28.
11. ENGBERG RM, KASPERS B, SCHRANNER I, KÖSTERS J, LÖSCH U. Quantification of the immunoglobulin classes IgG and IgA in the young and adult pigeon (*Columba livia*). Avian Pathology 1992;21:409-420.
12. ESKENS U, KALETA EF, UNGER G. Eine Herpesvirus-bedingte Enzootie – Pacheco´sche Papageienkrankheit – in einem Psittazidenbestand. Tierärztl Praxis 1994;22:542-553.
13. FREEMAN JD, GOODCHILD NL, MAGER DL. Odorless SDS-PAGE of Protein Using Sodium 2-Mercaptoethanesulfonate. BioTechniques 1994;17:263-265.
14. GASKIN JM, ROBBINS CM, JACOBSON ER. An explosive outbreak of Pacheco´s Parrot Disease an preliminary experimental findings. Proc Am Assoc Zoo Vet 1979:241-253.
15. GASKIN JM, ARNOLD BS, ROBBINS CM. An inactivated vaccine for psittacine herpesvirus infection (Pacheco´s Disease). Proc Am Assoc Zoo Vet 1980:102-105.
16. GASKIN JM, RAPHAEL B, MAJOR A, HALL G. Pacheco´s Disease: The search for the elusive carrier bird. Proc Am Assoc Zoo Vet 1981:24-28.
17. GERLACH H, ENDERS F, CASARES M, BREUER W, TRUYEN U, GRUND C. Eine Herpesvirusinfektion des Atmungsapparates bei Australischen Sittichen. Tierärztl Prax 2000;28(K):205-208.

18. GOUGH RE, ALEXANDER DJ. Pacheco`s disease in psittacine birds in Great Britain 1987 to 1991. *Veterinary Record* 1993;132:113-115.
19. GRAVENDYCK M, TRITT S, SPENKOECH-PIEPER H, KALETA EF. Antigenic Diversity of Psittacine Herpesviruses: Cluster Analysis of Antigenic Differences obtained from Cross-Neutralisation Test. *Avian Pathology* 1996;25:345-357.
20. GRAVENDYCK M, BALKS E, SCHRÖDER-GRAVENDYCK AS, ESKENS U, FRANK H, MARSCHANG RE, KALETA EF. Quantification of the herpesvirus content in various tissues and organs, and associated post mortem lesions of psittacine birds which died during an epornithic of Pacheco`s parrot disease (PPD). *Avian Pathology* 1998;27:478-489.
21. GYLSTORFF I (Hrsg.), GRIMM F. *Vogelkrankheiten*. Stuttgart: Ulmer Verlag 1998; 180-181.
22. HALPERN MS, MASON WS, COATES L, O`CONNEL AP, ENGLAND JM. Humoral immune responsiveness in duck hepatitis B virus-infected ducks. *Journal of Virology* 1987;61:916-920.
27. KALETA EF, HEFFELS U, NEUMANN U, MIKAMI T. Serological differentiation of 14 avian Herpesviruses by plaque reduction tests in cell cultures. *Proc 2<sup>nd</sup> Intern. Symp. of Vet. Lab. Diagn., Lucerne* 1980.
28. KALETA EF. Herpesvirusinduzierte Infektionen und Krankheiten des Vogels. *Tierärztl. Prax.* 1983;11:67-75.
29. KALETA EF. Herpesviruses of free-living and pet birds. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens* 1989:97-102.
30. KALETA EF, BRINKMANN MB. An Outbreak of Pacheco`s Parrot Disease in a psittacine bird collection and an attempt to control it by vaccination. *Avian Pathology* 1993;22:785-789.

31. KALETA EF, KRAUTWALD-JUNGHANNS M (Hrsg.). Kompendium der Ziervogelkrankheiten: Papageien, Tauben, Sperlingsvögel. Hannover: Schlütersche 1999; 275-278.
32. KRAUTWALD ME, FOERSTER S, HERBST W, SCHILDGER B, KALETA EF. Nachweis eines neuen Herpesvirus bei einem ungewöhnlichen Fall von Pachecoscher Krankheit bei Amazonen und Graupapageien. J. Vet. Med. 1988;B35:415-420.
33. KRAUTWALD ME, FOERSTER S, HERBST W, SCHILDGER B, SPENKOCHE-PIBER H. Heterogenicity of Pacheco´s disease and its causative agents. Proc Ann Assoc Avian Vet 1988:11-20.
34. LÖFFLER G, PETRIDES PE (Hrsg.). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 1997:290-315.
35. MAGNINO S, CONZO G, FIORETTI A, MENNA LF, RAMPIN T, SIRONI G, FABBI M, KALETA EF. An Outbreak of Pacheco´s Parrot Disease in Psittacine Birds recently imported to Campania, Italy: Isolation of Psittacid Herpesvirus 2. J. Vet. Med. 1996;B 43:631-637.
36. MCKINNEY MM, PARKINSON A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. Journal of Immunological Methods 1987; 96:271-278.
37. MEULEMANS G, HALEN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting infectious laryngotracheitis viral antibodies in chicken serum. Avian Pathology 1982;11:361-368.
38. MILLER TD, MILLAR DL, NAQI SA. Pacheco´s Disease Herpesvirus in Texas. Avian Diseases 1979;23(3):753-756.

39. MOCKETT AP, DARBYSHIRE JH. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 1981;10:1-10.
40. MODROW S, FALKE D. *Molekulare Virologie.* Spektrum Akademischer Verlag 1997;56-64.
41. MUTLU ÖF, SCHNEEGANß D, KORBEL R. Zum derzeitigen Vorkommen der Pachecoschen Krankheit bei Psittaziden. *Tierärztl. Prax.* 1991;19:64-67.
42. NEUMANN U, KALETA EF. Immunsystem und Immunreaktionen. In: Heider/Monreal (Hrsg.): *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels.* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena 1992:415-419.
43. NORTON TM, GASKIN J, KOLLIAS GV, HOMER B. Efficacy of Acyclovir against herpesvirus infection in Quaker parakeets. *Am J Vet Res* 1991;52:2007-2009.
44. PANIGRAHY B, GRUMBLES LC. Case Report – Pacheco’s Disease in Psittacine Birds. *Avian Diseases* 1983;28(3):808-812.
45. PHALEN DN, TOMASZEWSKI EL, JONES J, RADABAUGH CS, DAHLHAUSEN R, JENKINS T. Diagnosis of Parrots Infected with Pacheco´s Disease Viruses. *Proc Ann Assoc Avian Vet* 2001:87-89.
46. PIEPER K. Beitrag zum Nachweis der Virusausscheidung via Pharynx und Kloake bei gesunden und kranken Psittaziden unter besonderer Berücksichtigung der Herpesvirusinfektion – Vergleich klinischer und virologischer Befunde. *Diss Vet Med, Gießen* 1992.
47. PRICE CJ (Hrsg.). *Manual of parrots budgerigars and other psittacine birds.* Gloucestershire: British Animal Veterinary Association 1992:87-91.

48. RAIDAL SR, CROSS GM, TOMASZEWSKI E, GRAHAM DL, PHALEN DN. A serological survey for avian polyomavirus and Pacheco's disease virus in Australian cockatoos. *Avian Pathology* 1998;27:263-268.
49. RAMIS A, TARRES J, FONDEVILA D, FERRER L. Immunocytochemical study of the pathogenesis of Pacheco's Parrot Disease in budgerigars. *Veterinary Microbiology* 1996;52:49-61.
50. RITCHIE BW, KENNETH SL, GREENACRE CB, PESTI D, CAMPAGNOLI R, LUKERT PD. Vaccination for Control of Polyomavirus and Pacheco's Disease Virus in Psittacine Birds. *Proc Ann Assoc Avian Vet* 1997:23-41.
51. ROIZMANN B. The family Herpesviridae: general description, taxonomy and classification. In: Roizmann (Hrsg.): *Herpesviruses Vol. 1*. New York: Plenum Publish Corp 1982:1-23.
52. ROIZMANN B. Herpesviridae: a brief introduction. In: Fields (Hrsg.): *Virology*. New York: Raven Press 1990:1787-1794.
53. ROIZMANN B, BAINES J. The diversity and unity of herpesviridae. *Comp Immun Mikrobiol Infect Dis* 1991;14(2):63-79.
54. ROIZMANN B, SEARS AE. Herpes simplex viruses and their replication. In: Fields (Hrsg.): *Virology*. New York: Raven Press 1990:1787-1794.
55. SCHMIDT U. Herpesvirusinfektionen. In: Heider/Monreal (Hrsg.): *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena 1992:415-426.
56. SCHRÖDER-GRAVENDYCK AS, KALETA EF, MARSCHANG RE, GRAVENDYCK M. Differentiation of psittacine herpesvirus field isolates by restriction endonuclease analysis. *Avian Pathology* 2001;30:551-558.



57. SENNE DA, PEARSON JE, MILLER LD, GUSTAFSON GA. Virus Isolation from Pet Birds Submitted for Importation into the United States. *Avian Diseases* 1983;27(3):731-744.
58. SIMPSON CF, HANLEY JE. Pacheco's Parrot Disease of Psittacine Birds. *Avian Diseases* 1976;21(2):209-219.
59. SLAGHT SS, YANG TJ, VAN DER HEIDE L, FREDERICKSON TN 1978. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity. *Avian Dis.* 1978;22: 802-805.
60. SMITH GC. In my experience: Use of acyclovir in an Outbreak of Pacheco's Parrot Disease. *AAV today* 1987;1:55-56.
61. STEINKE A. Die Pachecosche Papageienkrankheit Verlauf, Diagnostik, Therapie und Impfmöglichkeiten anhand einer Kasuistik. DVG XI. Tagung der Fachgruppe „Geflügelkrankheiten“ 1998.
62. TOMASZEWSKI EL, VAN WILSON G, WIGLE WL, PHALEN DN. Detection and Heterogeneity of Herpesviruses Causing Pacheco's Disease in Parrots. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39/2:533-538.
63. TIJSSEN P, BURDON RH, VAN KNIPPENBERG PH. Practice and theory of enzyme immunoassays. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier 1985.
64. VOGEL K, KALETA EF. Herpesvirus-1-Infektion der Tauben. In: Heider/Monreal (Hrsg.): Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena 1992: 415-426.
65. WAGNER EK, BLOOM DC. Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clinical Microbiology Reviews* 1997;10:419-443.

66. YORK JJ, FAHEY KJ, BAGUST TJ. Development and Evaluation of an ELISA for the Detection of Antibody to Infectious Laryngotracheitis Virus in Chickens. *Avian Diseases* 1982;27(2):409-421.
  
67. YORK SM, YORK CJ. Pacheco virus vaccine studies. A preliminary report. Proc 32<sup>nd</sup> Western Poultry Disease Conference: Davis, California 1983:101-103.

## Danksagung

Bei Herrn Dr. Ch. Grund möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die intensive fachliche Unterstützung während der Versuchsphase und bei der Auswertung sowie der Erstellung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. R. Korbel möchte ich für die Übernahme der Arbeit und die innovative fachliche Betreuung danken.

Bei allen Doktoranden, ehemaligen Doktoranden und den Mitarbeitern der virologischen Abteilung des Instituts für Geflügelkrankheiten der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Arne, meiner Mutter und allen Freunden, die durch moralische und sachliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: von Schlippenbach, Katja  
Geburtsdatum: 18.12.1972  
Geburtsort: Augsburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1979-1983 Grundschule Gersthofen  
1983-1992 Paul-Klee-Gymnasium Gersthofen (Abitur 1992)

Studium:

1992-1995 Studium Sozialpädagogik FH, Vordiplom  
1995-2001 Studium Tiermedizin an der LMU München  
Approbation 18.04.2001

Berufstätigkeit:

seit Mai 2001 Angestellte der Tierarztpraxis Dr. Dirr, Gersthofen

Promotionsstudium:

seit Mai 2001 Thema: „Herstellung und Charakterisierung von Tauben-Immunglobulin Y-spezifischem Hyperimmunserum und Einsatz in der Pacheco-Serodiagnostik“  
(Institut für Geflügelkrankheiten, Oberschleißheim)