

Aus der Klinik für Vögel der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. R. T. Korb

Arbeit angefertigt unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. C. H. Grund

Charakterisierung von Papageien-Isolaten des  
Aviären Paramyxovirus Serotyp 1 (APMV-1) und  
Nachweis von nichtinfektiösen Paramyxovirus-Partikeln  
im Kot von subklinisch APMV-1-infizierten Psittaziden

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

von  
Ulrich Mohn  
aus Stuttgart

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. T. Korbel  
1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Peters  
2. Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. U. Matis  
3. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. K. Pfister  
4. Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. P. Kölle

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meinen Eltern

---

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1.	Die Newcastle Krankheit	3
2.2.	Taxonomie und Aufbau von APMV-1	3
2.2.1.	Feinstruktur des F-Proteins	7
2.2.2.	Feinstruktur des HN-Proteins	8
2.3.	APMV-1-Infektion	11
2.4.	Diagnostik und Charakterisierung von APMV-1 Stämmen	14
2.5.	Eigenschaften von APMV-1-Isolaten aus dem Rückenmark von Psittaziden	19
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1.	Verwendete Virusstämme und Immunsera	21
3.1.1.	Virusstämme	21
3.1.2.	Immunsera	21
3.2.	Haltung von SPF-Tauben und Gewinnung von $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren	22
3.3.	Hämagglutinations-Hemmungs-Test	23
3.4.	Hämagglutinations-Test	24
3.5.	RT-PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte	25
3.5.1.	RT-PCR	25
3.5.2.	Sequenzierung und Sequenzanalyse	27
3.6.	Versuche zur Sensitivitätsbestimmung der RT-(nested) PCR	29
3.7.	RT-nested PCR	30

---

3.8.	Virusisolierung und Virusvermehrung	31
3.9.	Viruspräparation für Elektronenmikroskopie und RT-nested PCR	32
3.10.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	33
3.10.1.	Negativkontrast	33
3.10.2.	Ultradünnschnitt	33
3.11.	Verdünnungslösungen	34
3.11.1.	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	34
3.11.2.	Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) Behandlung von Aqua bidestillata	34
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1.	Charakterisierung von Papageien-APMV-1-Isolaten	35
4.1.1.	Serologische Differenzierung	35
4.1.2.	Sequenzierung von sechs Papageien-APMV-1-Isolaten	37
4.1.2.1.	Sequenzvergleich mit repräsentativen APMV-1-Stämmen	38
4.1.2.2.	Untersuchungen innerhalb der Gengruppe II	45
4.1.2.3.	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz	49
4.2.	Entwicklung einer Nachweismethode für virale RNA des APMV-1 aus dem Kot von Papageien	56
4.2.1.	Optimierung der Extraktion von viraler RNA des APMV-1 aus dem Kot von Papageien	56
4.2.2.	Entwicklung einer RT-nested PCR zum Nachweis von viraler RNA des APMV-1 aus dem Kot von Papageien	58
4.3.	Untersuchung von Kotproben von Papageien	59
4.3.1.	Virusisolierung und RT-nested PCR	59
4.3.2.	Viruspräparationen aus aufgereinigten Kotproben: Untersuchungen im Elektronenmikroskop mittels Ultradünnschnitt-Technik und mit der RT-nested PCR	61

---

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1.	Charakterisierung von schwach virulenten Papageien-APMV-1-Isolaten	64
5.2.	Nachweis von nichtinfektiösen Paramyxovirus-Partikeln im Kot von Papageien	70
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	Danksagung	
	Lebenslauf	

## Abkürzungen

α-	anti-
AAF	Amnion-Allantois-Flüssigkeit
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
APMV-1	Aviäres Paramyxovirus Serotyp 1
As	Aminosäuren
BGBI	Bundesgesetz
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
cDNA	komplementäre DNA
CDS	coding sequence (kodierende Sequenz)
DANA	2-Deoxy-2,3-Dehydro-N-Acetylneuraminsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.	Tage (days)
DI	Dimer Schnittstelle (dimer interface)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EID <sub>50</sub>	mittlere Eiinfektiöse Dosis
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und andere (et alteri)
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunden (hours)
HA-Test	Hämagglutinations-Test
HAH-Test	Hämagglutinations-Hemmungs-Test
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HR	Sechser-Wiederholungssequenzen (heptad repeat)
ICPI	Intrazerebraler Pathogenitätsindex

---

IE	Infektiöse Einheiten
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IVPI	Intravenöser Pathogenitätsindex
l	Liter
log	Logarithmus
m	Meter
M	molar
mAk	monoklonale(r) Antikörper
MDT	Mittlere Absterberate (Mean death time)
mg	Miligramm
ml	Milliliter
Min.	Minuten
mind.	mindestens
mM	milimolar
mRNA	messenger RNA
μl	Mikroliter
N	Stickstoff
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
ND	Newcastle Krankheit (Newcastle Disease)
Nt	Nukleotide
NPMD	Neuropathische Magendilatation
OIE	Office International des Epizooties
ORF	Leserahmen (open reading frame)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
p.ch.	post challenge
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.i.	post infectionem



---

pmol	pikomol
PMV	Paramyxovirus
pPMV-1	Paramyxovirus des Serotyps 1 vom Taubentyp
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Reverse Transkriptase
SPF	spezifiziert pathogenfrei
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich
U/min	Umdrehungen pro Minute
US\$	Amerikanische Dollar
v.a.	vor allem
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

Aminosäure- und Nukleotidabkürzungen nach den Richtlinien der International Union of Biochemistry (IUB)

## 1. Einleitung

Aviäre Paramyxoviren des Serotyp 1 (APMV-1) sind als Erreger der atypischen Geflügelpest oder Newcastle Disease (ND) von weltweit großer Bedeutung. Sie weisen innerhalb der Klasse Aves ein breites Wirtsspektrum auf, welches auch Psittaziden einschließt (Kaleta und Baldauf, 1988). Abhängig vom dabei auftretenden Pathotyp ist der Krankheitsverlauf variabel. Hochakute verlustreiche Erkrankungen bei Papageien sind nach Infektion mit virulenten Pathotypen beschrieben (Erickson et al., 1977). Hinweise auf eine pathogene Bedeutung von schwach virulenten APMV-1-Pathotypen für Psittaziden ergaben sich aus der Isolierung von sechs APMV-1 aus dem Rückenmark von Papageien mit dem Befund der Neuropathischen Magendilatation (NPMD; Grund et al., 2002). Bei diesem Krankheitsbild handelt es sich um ein Malabsorptionssyndrom bei Psittaziden, basierend auf einer nichteitrigen Polyneuritis der intramuralen Ganglien des Magen-Darm-Traktes (Kaleta und Krautwald-Junghanns, 1999). Langzeitbeobachtungen von experimentell mit einem der Papageien-APMV-1-Isolate aus dem Rückenmark infizierten Graupapageien (*Psittacus erithacus*) konnten in vivo eine persistierende APMV-1-Infektion nachweisen (Grund, 2004). Epidemiologische Untersuchungen von Papageien weisen zudem auf eine weite Verbreitung von subklinischen APMV-1-Infektionen bei Papageien in Gefangenschaft (Grund, 2004). So wurden in 24,2 % der untersuchten Seren von Papageien ohne klinische Zeichen einer Paramyxovirus-Infektion APMV-spezifische Antikörper nachgewiesen. Bei 60,0 % der APMV-seropositiven Tiere waren elektronenmikroskopisch paramyxovirus-artige Partikel im Kot nachweisbar. Eine Isolierung des Erregers aus Kotproben durch das klassische Nachweisverfahren der Anzucht auf embryonierten spezifiziert pathogenfreien (SPF) Hühnereiern gelang jedoch bisher nicht. Daher stützen sich Untersuchungen über die mit einer subklinischen APMV-1-Infektion assoziierten Virustypen auf die sechs Papageien-APMV-1-Isolate aus dem Rückenmark. Diese konnten mittels Typisierung mit monoklonalen Antikörpern (mAk), sowie Bestimmung von Eigenschaften des Hämagglutinin-Neuraminidase- (HN-) Proteins wie Thermostabilität und Elutionsrate gegenüber APMV-1 vom Taubentyp (pPMV-1) und dem Impfstamm LaSota, nicht jedoch gegenüber dem Impfstamm B1 abgegrenzt werden. Im Vergleich zum

---

Impfstamm B1 wiesen die Papageien-APMV-1-Isolate jedoch eine geringere Virulenz in ovo auf (Grund et al., 2002).

Ziel der vorgelegten Arbeit ist es, die sechs Papageien-APMV-1-Isolate auf ihre Verwandtschaft zu B1-Impfstämmen zu untersuchen bzw. eine sensitive Methode zu etablieren, die spezifisch den Nachweis von mit dem Kot ausgeschiedenen APMV-1 ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden die Papageien-APMV-1-Isolate antigenetisch und auf molekularer Ebene charakterisiert. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine sensitive RT-nested PCR entwickelt, die eine Erreger-Typisierung erlaubt. Die Ergebnisse sollen Aussagen über die Eigenschaften der von subklinisch APMV-1 infizierten Psittaziden mit dem Kot ausgeschiedenen Erreger ermöglichen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Die Newcastle Krankheit**

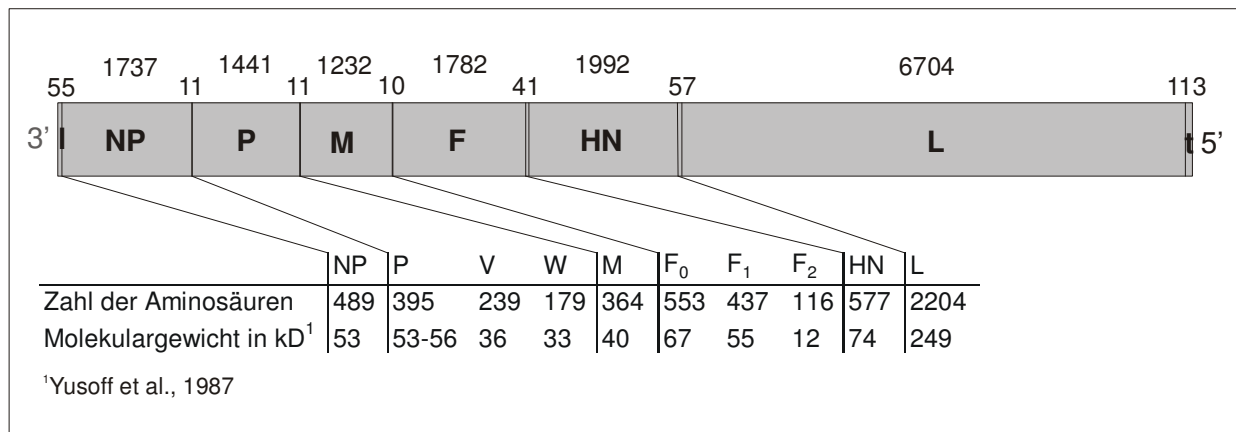
Die Newcastle Krankheit (Newcastle Disease, ND) oder Atypische Geflügelpest ist eine durch Aviäre Paramyxoviren Serotyp 1 (APMV-1) ausgelöste seuchenartig verlaufende, hochkontagiöse Erkrankung. Sie stellt eine nahezu weltweite (Alexander, 1997) Bedrohung für das Wirtschaftsgeflügel dar und wird aufgrund ihrer ökonomischen Bedeutung vom Office Internationale des Epizooties (OIE) in die Liste A der Tierseuchen eingeteilt. Basierend auf der Entscheidung 93/152/EWG der Europäischen Kommission ist ND in Deutschland eine anzeigepflichtige Tierseuche, deren Bekämpfung sich auf die Impfpflicht aller Hühner- und Truthühner kombiniert mit einer „Stamping-out“-Politik stützt.

Hinweise in der Literatur deuten darauf hin, dass bereits vor 1926 Ausbrüche dieser hochpathogenen Seuche existierten (siehe dazu: Alexander, 2001). Erstmals beschrieben wurde das Auftreten von ND im Jahr 1926 an zwei geographisch getrennten Stellen: In Newcastle-upon-Tyne, England (Doyle, 1927) und auf der Insel Java, heute zu Indonesien gehörend (Kranefeld, 1926). Insgesamt sind für ND vier große Panzootien dokumentiert. Die erste reichte von der Erstbeschreibung der Erkrankung bis in die 1950er Jahre. Der zweite Seuchenzug begann in den 1960er Jahren und dauerte bis in die frühen 1970er Jahre und der dritte trat in den 1980er Jahren vor allem bei Tauben auf. Die vierte Panzootie fand in den 1990er Jahren statt. Beim zweiten und dritten Seuchenzug wird ein Ursprung im Mittleren Osten angenommen, während der vierte erneut von Südostasien ausging.

### **2.2. Taxonomie und Aufbau von APMV-1**

Taxonomisch werden Aviäre Paramyxoviren des Serotyps 1 zusammen mit weiteren acht Serotypen (APMV-2 bis 9; Alexander, 1986) dem Genus *Avulavirus* der Unterfamilie *Paramyxovirinae* innerhalb der Familie der *Paramyxoviridae* zugeordnet (Mayo, 2002). Die Virusfamilien *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* und *Filoviridae* sowie

*Bornaviridae* bilden zusammen die Ordnung der *Mononegavirales*. Dabei handelt es sich um behüllte Viren mit einzelsträngigem kontinuierlichem RNA-Genom in Negativorientierung.

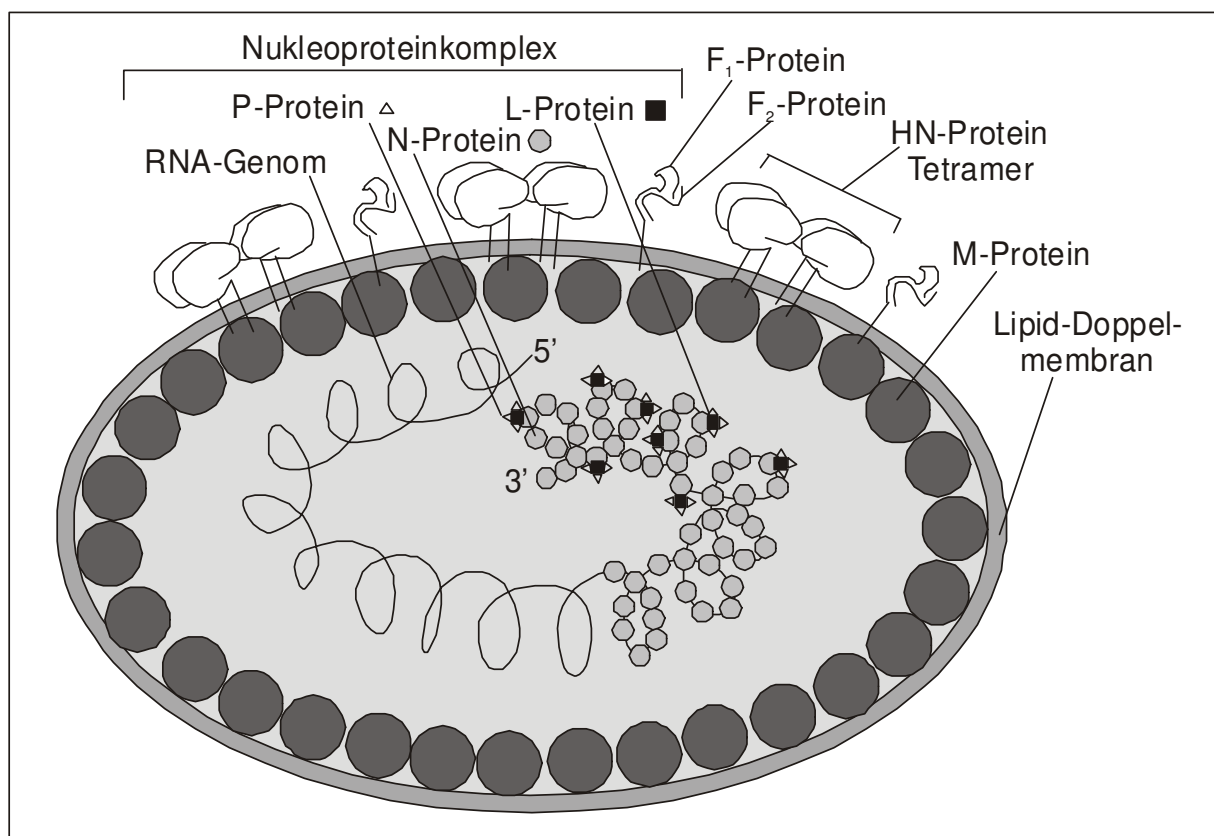


**Abb. 1. Darstellung des Genoms von APMV-1.** Zahlen über dem Modell beziehen sich auf die Länge der jeweiligen Genabschnitte bzw. intergenischen Sequenzen (Zahl der Nucleotide). l: Leadersequenz; NP: Nukleoprotein-; P: Phosphoprotein-; M: Matrixprotein-; F: Fusionsprotein-; HN: Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein-; L: Large-Protein-Gen; t: Trailersequenz.

Die genomische RNA von APMV-1 ist 15.186 Nucleotide lang und enthält sechs Gene, die für Proteine in der Reihenfolge 3'- NP – P – M – F – HN – L -5' (Abb. 1; de Leeuw und Peeters, 1999; Krishnamurthy und Samal, 1998; Römer-Oberdörfer et al., 1999) kodieren. Das 3'-Ende der genomischen RNA enthält eine Leader- und das 5'-Ende eine Trailer-Sequenz (Kurilla et al., 1985; Yusoff et al., 1987). Die sechs Protein-Gene werden durch intergenische Regionen verschiedener Länge (1 bis 57 Nucleotide) voneinander getrennt, welche für das Beenden der mRNA-Transkription des vorhergehenden und die erneute Initiation der Transkription des nachfolgenden Genes verantwortlich sind. Dies führt zu sechs „gecappten“ und methylierten mRNAs (Ishada et al., 1986; Millar et al., 1986, Phillips et al., 1998; Yusoff et al., 1987). Für die Bildung neuer Virusgenome wird ein durchgehendes komplementäres RNA-Molekül in Positivstrangorientierung synthetisiert, das als Matrize für neue RNA Genome dient (Duesberg und Robinson, 1965).

Die genomische RNA ist mit dem NP-Protein zu einem helikal angeordneten Nukleoproteinkomplex aggregiert. Dabei bindet ein NP an sechs Nucleotide der RNA

(Kolakofsky et al., 1998) und bildet so eine fischgrätenähnliche Struktur, welche bei aufgebrochenen Partikeln im Elektronenmikroskop beobachtet werden kann und in deren zentralem Kanal die RNA liegt. Das NP dient als Schutz der RNA vor Nukleasen und verleiht gleichzeitig der RNA die für eine Verpackung in Viruspartikel notwendige Flexibilität. Es interagiert mit den nichtkovalent an sie gebundenen P- und L-Proteinen im Sinne eines viralen Transkriptase-Komplexes (Abb. 2; Hamaguchi et al., 1983 und 1985).



**Abb. 2. Schematische Darstellung des Aufbaus eines APMV-1 Partikels.**  
Anzahl und Position der dargestellten Proteine haben keine Bedeutung.

Das L-Protein hat die Eigenschaft einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Lamb und Kolakofsky, 2001), die aber ohne die P- und NP-Proteine nicht wirken kann (Yusoff und Tan, 2001), und das P-Protein ergänzt die Polymeraseaktivität des L-Proteins (Hamaguchi et al., 1983 und 1985) und bildet zusammen mit diesem und dem NP-Protein das Nukleokapsid (Kho et al., 2003, 2004). Neben dem P-Protein kodiert das P-Gen für zwei Nichtstrukturproteine, das V- und das W-Protein (McGinnes et al.,

1988; Steward et al., 1993). Durch posttranskriptionelle Insertion von ein (V-Protein) oder zwei (W-Protein) Guanosinresten (G) an der Nukleinsäureposition 484 des P-mRNA-Transkripts (Editing), kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zur Translation der Nichtstrukturproteine V und W (Steward et al., 1993; Locke et al., 2000). Über die Funktion der V- und W-Proteine ist wenig bekannt. Das V-Protein ist bei APMV-1 mit dem Viruspartikel assoziiert und enthält ein konserviertes Motiv, welches einem Zink(finger) bindenden Protein ähnelt (Samson et al., 1991; Steward, 1993) sowie eine Cystein reiche C-terminale Region, die wahrscheinlich an der Replikation und Pathogenese des Virus beteiligt sind und Einfluss auf die Virulenz haben (Mebatsion et al., 2001, 2003). Neuere Befunde weisen auf eine Beteiligung des V-Proteins am Schutz vor Typ 1 Interferon (Huang et al., 2003).

Das relativ hydrophobe nicht-glykosilierte M-Protein (Abb. 2) interagiert mit dem Nukleokapsid, v.a. dem NP-Protein, und wird beim Virus-Assembly von innen an die Plasmamembran der Wirtszelle angelagert. Es verleiht der Lipid-Doppelmembran freigesetzter Virione von der Innenseite her Stabilität. Das M-Protein ist für die Bildung der Viruspartikel und die Verpackung der viralen RNA im Verlauf der Morphogenese und des Virus-Assembly von großer Bedeutung (Yusoff und Tan, 2001). Ebenfalls in die Lipid-Doppelmembran eingelagert sind zwei verschiedene Glykoproteine - das HN- und das F-Protein. Diese bilden in Wechselwirkung mit dem M-Protein eine Matrixproteinschicht aus. Die Membran der Wirtszelle stülpt sich aus und die so entstandenen neuen Viruspartikel werden freigesetzt. Diese Viruspartikel sind von pleomorpher Gestalt, sphärisch oder filamentös und haben einen Durchmesser von 100 bis 500 nm (Yusoff und Tan, 2001).

Während der Neuinfektion von Zellen interagieren die beiden Oberflächen-Glykoproteine (Stone-Hulsander und Morrison, 1997). Diese besitzen elementare Funktionen im Ausschleusungsprozess sowie bei der Anheftung an und beim Eindringen in neue Wirtszellen. Das HN-Protein bindet an sialinsäurehaltige Rezeptoren der Zielzellen. Da auch Erythrozyten diese Oberflächenstrukturen aufweisen, führt dies in vitro zu einer für die APMV-1 Diagnostik genutzten Hämagglutination. Zusätzlich besitzt das Protein eine Neuraminidase-Aktivität (NA; N-Acetyl-Neuraminy-Hydrolase-Aktivität; Scheid und Choppin, 1973). Diese Eigenschaft bewirkt die Abspaltung des HN-Proteins vom Rezeptor der Wirtszelle und verhindert

beim Ausschleusen des Virus eine Inkorporation der Rezeptoren in die Virushülle. Die NA ist aber auch essentiell für die Funktionalität der Hämagglutination (Iorio et al., 2001). Die dritte Funktion des HN-Proteins ist die Unterstützung der Aktivität des zweiten Oberflächenproteins, des F-Proteins (Deng et al., 1995; Sergel et al., 1993; Tanabayashi und Compans, 1996; Stone-Hulsander und Morrison, 1997). Dieses Protein induziert bei freigesetzten Virionen nach Adsorption an eine Zielzelle die Fusion der viralen mit der zellulären Membran.

### 2.2.1. Feinstruktur des F-Proteins

Das F-Protein ist ein Typ-I-Membranprotein mit einem kurzen intracytoplasmatischen Bereich (Aminosäuren 527 bis 553) und einem transmembranen Bereich (Aminosäuren 496 bis 526) sowie einer Ektodomäne (Aminosäuren 1 bis 496). Elektronenmikroskopisch stellt es sich als 10-13 nm langer Fortsatz dar (Scheid, 1987). Zelluläre Proteasen spalten das funktionell inaktive F<sub>0</sub>-Protein (553 Aminosäuren) in das carboxyterminal in der Membran verankerte F<sub>1</sub>- (Aminosäuren 117 bis 553) und das aminoternale F<sub>2</sub>-Protein (Aminosäuren 1 bis 116; Nagai et al., 1976; Nagai und Klenk, 1977), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Chen et al., 2001). Die Spaltbarkeit des F<sub>0</sub>-Proteins ist für verschiedene Isolate unterschiedlich und stellt einen entscheidenden Faktor für die Virulenz dar (siehe 2.4.). Im Anschluss an die Spaltstelle (Aminosäure 112 bis 116) befindet sich innerhalb des F<sub>1</sub>-Protein ein Fusionspeptid (Aminosäure 117 bis 130), das maßgeblich an der Verschmelzung des Virus mit der Zellmembran beteiligt ist. Bei Paramyxoviren wurde ein zweites Fusionspeptid identifiziert (Peisajovich et al., 2000; Samuel and Shai, 2001), welches den Aminosäuren 221 bis 230 auf dem APMV-1 F-Protein entsprechen würde. Eine Reihe von Sechser-Wiederholungssequenzen (heptad repeats, HR1 bis HR4; Chen et al., 2001) sind wichtig für die richtige Faltung und Oberflächenexpression des F-Proteins (Morrison, 2003) und können durch Komplexbildung zu einer Konformationsänderung beitragen (Joshi et al., 1998; Young et al., 1999). Ein HN-vermittelter Kontakt zwischen Virus- und Wirtszellmembran führt also zu einer Konformationsänderung des F-Proteins (McGinnes et al., 2002) und zu



einer Annäherung des Fusionspeptids an die Zellmembran, was eine Verschmelzung der äußeren Membranschichten bewirkt (Hernandez et al., 1996, Morrison, 2002).

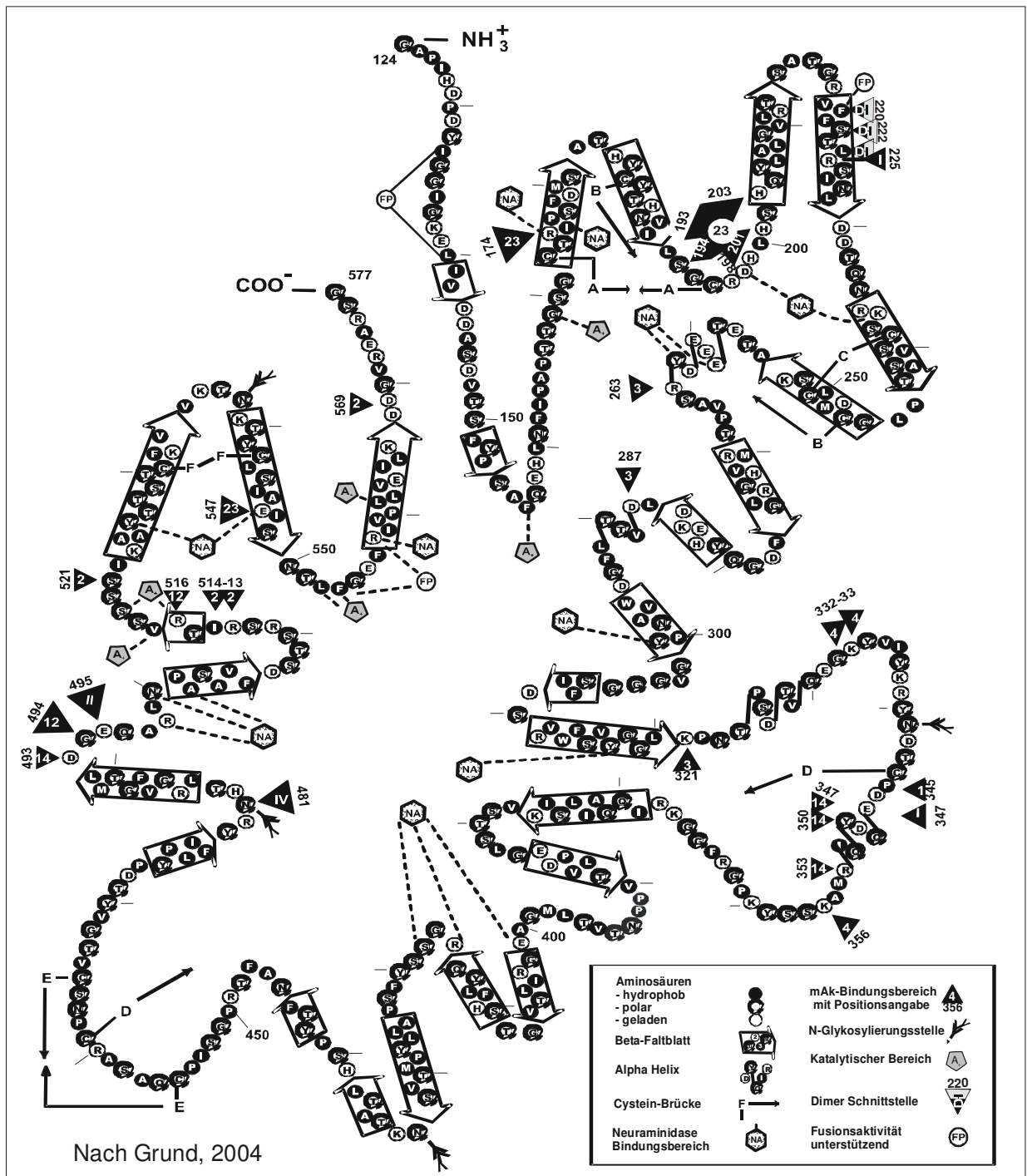
### 2.2.2. Feinstruktur des HN-Proteins

Aufgrund der zentralen Rolle des HN-Proteins bei der Bindung von Virionen an die Zielzelle bzw. bei deren Freisetzung und wegen seiner antigenetischen Eigenschaften, liegen über dieses Oberflächenglykoprotein bereits umfangreiche und detaillierte Untersuchungen vor. Das HN-Gen ist ca. 2000 Nukleotide lang und kodiert je nach Position des Stopcodons für den HN-Leserahmen bei verschiedenen APMV-1 Stämmen für ein 571, 577 oder 616 Aminosäuren (As) langes Protein (Sakaguchi et al., 1989). Das HN-Protein mit 616 As dient als Vorläufer-Protein HN<sub>0</sub> (Nagai et al., 1976; Nagai und Klenk, 1977), welches durch proteolytisches Abspalten eines glykosilierten Fragmentes in seine biologisch aktive Form überführt wird. Abhängig von der benutzten Protease können dabei unterschiedliche Carboxy-Termini entstehen (Schuy et al., 1984). Bei den meisten APMV-1 Stämmen befindet sich das Terminationscodon vor dem Stopcodon für HN<sub>0</sub>, so dass HN-Proteine von 571 oder 577 As Länge entstehen. Diese benötigen keine proteolytische Abspaltung um funktionell aktiv zu werden (Alexander, 1997b). Die Länge des HN-Proteins scheint nach neueren Untersuchungen nicht die Pathogenität des Virus zu beeinflussen (Römer-Oberdörfer et al., 2003).

Das HN-Protein ist elektronenmikroskopisch als 12-15 nm langer Fortsatz (Spike) mit dünnem Schaft und kugelig erscheinender Oberfläche zu erkennen (Scheid, 1987). Aufgrund der Position des transmembranen Bereiches in der Amino-terminalen Region wird es als Typ II Membranprotein bezeichnet. Der intrazytoplasmatische Anteil wird von den N-terminalen Aminosäuren (Aminosäure 1 bis 26) gebildet. Die darauf folgende stark hydrophobe Region (Aminosäure 27 bis 48) stellt den transmembranen Anteil dar (Morrison und Portner, 1991). Daran anschließend folgt die Ektodomäne, die sich in einen Stiel (Aminosäuren 49 bis 123) und einen globulären Kopf gliedert (Abb. 3). Übereinstimmend mit anderen Neuraminidasen bilden  $\beta$ -Faltblattstrukturen im globulären Kopf des HN-Proteins eine Propellerstruktur mit einem katalytischen

Zentrum (Colman, 1994; Langedijk et al., 1997). Diese Struktur wird durch sechs konservierte intramolekulare Cysteinbrücken (Abb. 3, A bis F) stabilisiert (McGinnes und Morrison, 1994a, 1994b). Das HN-Protein bildet Homo-Dimere, die sich zu Tetrameren zusammenlagern (Crenell et al., 2000; McGinnes und Morrison, 1994a; Mirza et al., 1993). Dazu ist zusätzlich ein Cystein-Rest in der Region des HN-Stieles (Aminosäure 123) beschrieben, der die HN-Homodimere kovalent verbindet (Sheehan et al., 1987), bei einigen Stämmen jedoch durch Tryptophan ersetzt ist (Sakaguchi et al., 1989). Mutationsanalysen an der Dimer-Schnittstelle konnten einen temperaturabhängigen Einfluss dieses Bereichs auf die Rezeptorbindung mit Auswirkungen auf die Fusionsaktivität nachweisen (Abb. 3; DI; Corey et al., 2003). Von vier genutzten N-Glykosilierungsstellen liegen drei im globulären Kopf (Abb. 3; Aminosäure 341, 433 und 481), während die vierte im Stiel der Ektodomäne (As 119) lokalisiert ist (McGinnes und Morrison, 1995).

Die funktionell wichtigen Bereiche der Rezeptorerkennung und Neuraminidase-Aktivität scheinen entsprechend der komplexen Struktur des HN-Protein-Moleküls konformationsabhängig zu sein. So definieren Selektionsmutanten die Bindungsbereiche von mAk mit hemmenden Eigenschaften für Neutralisation, Rezeptorbindung und Neuraminidase-Aktivität als diskontinuierliche Epitope (Abb. 3). Neben Bereichen, bei denen die Bindung von mAk nur zu einer Neutralisierung des Virus führen, dabei aber keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung oder Neuraminidasefunktion haben (Abb. 3, Epitop 3 und 4; Iorio und Bratt, 1983; Iorio et al., 1992) führt die Blockierung anderer Epitope zu einer Neutralisation und verminderten Rezeptorbindung (Abb. 3, Epitop 1 und 14; Iorio und Bratt, 1983; Iorio et al., 1986, 1991). Bei den meisten der bisher definierten Epitope führt die Bindung von mAk jedoch sowohl zur Neutralisation als auch zu einer reduzierten Rezeptorbindung und Neuraminidasefunktion (Abb. 3, Epitop I, II, 2, 12, und 23; Iorio und Bratt, 1983; Iorio et al., 1989a, 1989b, 1991, 2001; Gotoh et al., 1988; Fournier et al., 2004). Kristallographische Darstellungen der Wechselwirkung des globulären HN-Proteinkopfes mit dem Neuraminidase-Inhibitor 2-Deoxy-2,3-Dehydro-N-Acetylneuraminsäure (DANA; Crenell et al., 2000; Zaitsev et al., 2004; Abb. 3) sowie Mutationsanalysen (Connaris et al., 2002; Iorio et al., 2001) weisen darauf hin, dass ein gemeinsamer Bereich im globulären Kopf Rezeptorbindung, Neuraminidase- und Fusionsaktivität



**Abb. 3. Modell des globulären Anteils (Aminosäure 124 bis 577) des HN-Proteins.** Darstellung der Sekundärstruktur beruht auf kristallographischen Untersuchungen. Intramolekulare Cysteinbrücken (A-E), N-Glykosylierungsstellen, Bindungsepitope monoklonaler Antikörper und funktionell wichtige Stellen sind eingezeichnet.

beeinflusst. Demnach wird angenommen, dass es verschiedene Konformationen des HN-Proteins gibt, die jeweils zu unterschiedlichen Funktionszuständen führen. Nach Rezeptorbindung könnte zum Beispiel eine Änderung der Konformation den Zustand der Neuraminidase- bzw. Fusions-Aktivität herbeiführen. Untersuchungen an chimären rekombinanten APMV-1 zeigen, dass die Aminosäuresequenz des HN-Proteins eine wesentliche Rolle für Tropismus und Virulenz des jeweiligen Stammes spielt (Gravel und Morrison, 2003; Huang et al., 2004).

### 2.3. APMV-1-Infektion

APMV-1 hat ein sehr breites Wirtsspektrum und konnte bei 236 Spezies aus 27 von 50 Ordnungen der Klasse Aves nachgewiesen werden (Kaleta und Baldauf, 1988). Die Verbreitung von ND erfolgt über belebte und unbelebte Vektoren (Alexander, 1986). Eintrittspforten für den Erreger sind Konjunktiva, Respirations- und Digestionstrakt. Abhängig von der betroffenen Vogel-Spezies und dem auftretenden Pathotyp sind die Krankheitsverläufe sehr variabel. Basierend auf klinischen Krankheitsanzeichen kann eine Einteilung in fünf Pathotypen nach den Infektionsverläufen beim Haushuhn (*Gallus gallus var. dom.*) folgendermaßen zusammengefasst werden (Beard und Hanson, 1984):

- A) Die **viscerotrop velogene** Form mit akutem, letalem Verlauf, bei der vor allem hämorrhagische Läsionen des Digestionstraktes beobachtet werden.
- B) **Neurotrop velogene** Verläufe mit akuten, neurologischen oder respiratorischen Symptomen, die meist letal sind.
- C) Bei der **mesogenen** Form treten Todesfälle meist nur bei Küken auf. Allgemeinsymptome stehen im Vordergrund.
- D) Viren vom **lentogenen** Pathotyp werden oft als Lebendvakzinen benutzt und rufen bei Küken evtl. schwache respiratorische Symptome hervor, bleiben bei adulten Tieren jedoch meist inapparent.
- E) Bei **asymptomatischen** Verläufen handelt es sich um noch schwächer pathogene lentogene Erreger, die nach Infektion des Digestionstraktes meist zu einer Serokonversion führen ohne klinische Symptome zu hervorzurufen.

Bei Seuchenzügen von ND werden normalerweise velogene (A, B) oder mesogene (C) APMV-1-Stämme isoliert, während z.B. lentogene (D) Stämme in der Geflügelindustrie als Lebendvakzinen verwendet werden. Weltweit werden dafür am häufigsten die Impfstämme B1 (Hitchner und Johnson, 1948; Hitchner, 1975) und LaSota (Goldhaft, 1980; Hanson und Brandly, 1955) benutzt.

Als besonders empfänglich für eine APMV-1-Infektion gilt neben dem Huhn auch die Pute. Andere Vogelspezies können teilweise infiziert sein, ohne klinische Symptomatik zu zeigen und daher als Reservoir bzw. Vektoren fungieren (Kaleta und Baldauf, 1988). Wassergeflügel gilt beispielsweise als empfänglich für eine APMV-1-Infektion, jedoch als relativ resistent gegenüber Krankheitsanzeichen. So ist die Übertragung durch Kormorane bei verschiedenen ND-Ausbrüchen in Kanada und den Vereinigten Staaten beschrieben (Heckert et al., 1996). Experimentell infizierte Kormorane schießen pathogenes Virus aus, zeigten jedoch keine klinischen Symptome (Kuiken et al., 1998).

Demgegenüber treten bei Tauben APMV-1-Stämme auf, die sich von klassischen APMV-1-Stämmen unterscheiden und als Taubentyp (pigeon paramyxovirus serotype 1, pPMV-1) bezeichnet werden. In Deutschland ist pPMV-1 endemisch und führt zu verlustreichen Erkrankungen, die mit Polyurie, Diarrhoe und schweren neurologischen Symptomen einhergehen (Kaleta et al., 1985). In Hühnern induziert pPMV-1 erst nach mehrfachen Tierpassagen klinische Erkrankungen (Kommers et al., 2001), kann dann aber einen seuchenhaften Verlauf annehmen. Dokumentiert ist dies für einen Ausbruch in Großbritannien im Jahr 1984, als Futter in Lagerhallen durch Kot und Kadaver von pPMV-1-erkrankten Wildtauben kontaminiert wurde (Alexander et al., 1985). Weitere ND Ausbrüche in Irland und Großbritannien 1991 und 1992 wurden ebenfalls durch APMV-1 vom Taubentyp verursacht (Werner, 1995).

Auch bei Papageien (*Psittaciformes*) stellt die APMV-1-Infektion eine wichtige Infektionskrankheit dar, die insbesondere in Importstationen (Senne et al., 1983) und Zuchtbeständen (Bunning-Fann et al., 1992; Panigrahy et al., 1993) zu verlustreichen Ausbrüchen führt (Wachendörfer und Luthgen, 1971; Alexander et al., 1977). Dabei kann es, wie in der Vergangenheit z.B. in der Schweiz (Ehrsam et al., 1975) und Österreich (Grausgruber, 1972) beobachtet, durch importierte Papageien zur Verbreitung von virulenten Stämmen auch mit Einbruch in Wirtschaftsgeflügelbestände

kommen. Der wohl bedeutendste durch importierte Papageien ausgelöste Seuchenzug wurde Anfang der 1970er Jahre in den USA beobachtet (Hanson et al., 1973; Walker et al., 1973). Die Kosten für das damals durchgeführte Eradikationsprogramm beliefen sich bis zum Dezember 1972 auf 18.869.471 US\$ (Walker et al., 1973). Dabei sind wirtschaftliche Schäden durch Handelsbeschränkungen nicht berücksichtigt. Der wirtschaftlichen und seuchenpolitischen Relevanz von Psittaziden als Reservoir und Vektoren für APMV-1-Infektionen wird durch amtliche Schutzmaßnahmen Rechnung getragen (2000/666/EG, 2000). So ist der Import von Papageien in die EU erst nach einer mindestens 30tägigen Quarantäne und nach dem Nachweis, dass die Tiere nicht mit APMV-1 infiziert sind, möglich. Papageien und Sittiche sind nach der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle Krankheit (Geflügelpestverordnung; BGBl. I) explizit in die Seuchenbekämpfung mit einbezogen. Klinisch treten bei Papageien und Sittichen je nach Pathotyp wie für Hühner beschrieben (Beard und Hanson, 1984) verschiedene Ausprägungen der Erkrankung auf (Gerlach, 1994), deren Schwere wiederum von der betroffenen Spezies abhängen kann (Kaleta und Baldauf, 1988) und bei denen Mortalitäten bis zu 100 % erreicht werden (Ehram et al., 1975; Lüthgen und Wachendörfer, 1970; Lüthgen, 1973, 1981; Pohl, 1971). Initial zeigen die Tiere meist struppiges Gefieder, wässrigen Durchfall und Polyurie und sterben nach einigen Tagen. Bei progressivem Verlauf treten verschiedenartige Störungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) hinzu (Panigrahy et al., 1993; Erickson et al., 1977; Sallermann, 1973; Winteroll und Grimm, 1974).

Neben solchen akuten Infektionen mit velogenen APMV-1-Stämmen gibt es verstärkt Anzeichen für persistierende subklinische Infektionen bei Papageien. Hinweise auf eine derartige Infektion ergaben sich aus der Isolation von APMV-1 mit geringer Virulenz aus dem Rückenmark von verstorbenen Papageien mit pathologischen Veränderungen der Neuropathischen Magendilatation (NPMD; Grund et al., 2002). Bei dieser chronischen Erkrankung kommt es durch eine nicht eitrige Polyneuritis zu einer Schädigung der intramuralen Ganglien des Magen-Darm-Traktes. Der dadurch bedingte Motilitätsverlust des Magen-Darm-Traktes führt zu einer Futter-Anschoppung insbesondere im Drüsenmagen und zu einem Malabsorptions-Syndrom. Klinisch kommt es zu einem progressiven Gewichtsverlust bzw. zur Kachexie und zu einer schubweisen Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Während dieser Schübe sind

auch zentralnervöse Störungen wie Ataxie und Tremor des Kopfes oder der Flügel zu beobachten (Heldstab et al., 1985; Hughes, 1984; Kaleta und Krautwald-Junghanns, 1999; Woerpel und Rosskopf, 1984). Folgende Studien konnten zeigen, dass eine subklinische APMV-Infektion bei Papageien in Gefangenschaft verbreitet ist. Dies belegen epidemiologische Untersuchungen von Papageien ohne klinische Symptome einer akuten APMV-1-Infektion (Grund, 2004). Bei 24,0 % der untersuchten Seren (n = 170) waren mittels ELISA und Bestätigung der viruspezifischen Seroreaktivität im Western-Blot APMV-spezifische Antikörper nachweisbar. Durch elektronenmikroskopische Untersuchung von Kotproben (n = 185) wurde zudem bei 38,4 % der Vögel eine produktive APMV-Infektion nachgewiesen.

#### **2.4. Diagnostik und Charakterisierung von APMV-1-Stämmen**

APMV-1 Isolate unterscheiden sich erheblich in ihrer Virulenz. Für die diagnostische Beurteilung mit den sich daraus ergebenden Konsequenzen ist daher eine Typisierung von APMV-1-Isolaten nach Pathotypen essentiell. Deshalb wird bei der konventionellen Labordiagnostik zuerst eine Erregerisolierung in der Eikultur durchgeführt, und anschließend festgestellt, ob das Virus entsprechend dem induzierten klinischen Bild als velogen, mesogen, lentogen oder apathogen anzusprechen ist. Diese biologische Unterscheidung in Pathotypen kann gesichert nur im Tierexperiment durchgeführt werden. International hat sich dabei der Intrazerebrale Pathogenitätsindex (ICPI) in Eintagsküken (*Gallus gallus var. dom.*) durchgesetzt. Der ICPI dient weltweit als Richtgröße für die Virulenz von APMV-1 Isolaten (OIE, 2001; 92/66/EWG, 1992). Er ergibt sich nach intracerebraler Inokulation von Eintagsküken mit virushaltiger AAF aus der klinischen Beurteilung der Küken (Alexander, 1989; 92/66/EWG; Werner et al., 1999). APMV-1-Isolate mit einem ICPI > 0,7 werden als seuchenrelevant beurteilt und staatliche Bekämpfungsmaßnahmen eingeleitet. Zwei weitere Pathogenitätstests werden heutzutage angewendet: Der intravenöse Pathogenitätsindex (IVPI) ist ebenfalls eine Indexzahl und bewertet die klinischen Befunde bei intravenös infizierten 8 Wochen alten Hühnerküken. Als Mean Death Time (MDT) bezeichnet man die mittlere Absterberate in Stunden nach Beimpfung von 11-

täglich bebrüteten Hühnereiern. Eine Möglichkeit zur Einschätzung der Virulenz von APMV-1-Isolaten in vitro stellt die Plaquebildung in der Zellkultur dar. Lentogene APMV-1-Stämme bilden im Gegensatz zu velogenen und mesogenen Isolaten in Hühnerembryofibroblasten- (HEF-) Kulturen keine Plaques (Reeve und Poste, 1971; Schloer und Hanson, 1968). Die Ursache dafür liegt in einer fehlenden proteolytischen Spaltung des F<sub>0</sub>-Proteins dieser Stämme durch zelluläre Proteasen der HEF-Zellen (Nagai et al., 1976; Nagai und Klenk, 1977; Rott, 1979). Erst die Zugabe von Trypsin oder trypsinartigen Enzymen führt deshalb bei lentogenen APMV-1-Stämmen zu einer extrazellulären Spaltung des F<sub>0</sub>-Proteins (Nagai et al.; 1976) und damit zur Plaquebildung (Rott, 1985). Da nur in Zellen des Digestions- und Respirationstraktes trypsinartige Proteasen in aktiver Form vorliegen (Ogasawara et. al. 1992), sind Tochtervirione von lentogenen Stämmen nur in diesen Organgewebe infektiös. Im Gegensatz dazu besitzen virulente Viren ein F<sub>0</sub>-Protein, das von verschiedenen

**Tab. 1: Vergleich der Nuklein- und Aminosäuresequenz verschiedener APMV-1-Isolate im Bereich der proteolytischen Spaltstelle des Fo-Proteins**

Isolat <sup>3</sup>	Virulenz	F <sub>1</sub> -Gen <sup>1</sup>													F <sub>2</sub> -Gen <sup>1</sup>				
		4877	4878	4879	4880	4881	4882	4883	4884	4885	4886	4887	4888	4889	4890	4891	4892	4893	4894
<b>B1 Konsensus</b> #871/Papagei LAS/00 ULS/67	lentogen	G	G	G	A	G	A	C	A	G	G	G	G	C	G	C	C	T	T
	lentogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	lentogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	lentogen	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-
<b>GB 760/83</b> BEA/45	mesogen	-	-	-	-	-	G	-	-	-	A	A	A	-	-	-	T	-	-
	mesogen	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	-	-	-	T	-	-
<b>Timney Simb./90</b> MIY/52 Kakadu Indon./90 AV/32	velogen	A	-	-	-	-	G	-	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-
	velogen	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	T	-	-
	velogen	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	-	-	-	T	-	-
	velogen	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	-	-	-	T	-	-

Isolat <sup>3</sup>	Virulenz	F <sub>2</sub> -Protein <sup>2</sup>						F <sub>1</sub> -Protein <sup>2</sup>
		112	113	114	115	116	117	
<b>B1 Konsensus</b> #871/Papagei LAS/00 ULS/67	lentogen	G	R	Q	G	R	L	
	lentogen	-	-	-	-	-	-	
	lentogen	-	-	-	-	-	-	
	lentogen	-	K	-	-	-	-	
<b>GB 760/83</b> BEA/45	mesogen	-	-	-	K	-	F	
	mesogen	R	-	-	K	-	F	
<b>Timney Simb./90</b> MIY/52 Kakadu Indon./90 AV/32	velogen	R	-	-	R	-	F	
	velogen	R	-	-	R	-	F	
	velogen	R	-	-	K	-	F	
	velogen	R	-	-	K	-	F	

1 Nukleinsäurepositionen bezogen auf das Gesamt-Genom (B1 Takaaki 01)

2 Aminosäureposition bezogen auf das F<sub>0</sub>-Protein

3 NCBI-Zugangsnummer für benutzte Sequenzen siehe Tab. 5, #871 aus Grund und Goltz, 2001

- Aminosäure/Nukleinsäure identisch zur B1-Konsensussequenz



Proteasen gespalten werden kann. Sie sind pantrop und werden in zahlreichen Organen in ihre infektiöse Form überführt. Basische Aminosäuren im Bereich der F<sub>0</sub>-Protein-Spaltstelle (Aminosäure 112 bis 116) schienen dabei eine bedeutende Rolle zu spielen (Glickman et al., 1988; Long et al., 1988; Millar et al., 1988; Toyoda et al., 1987). Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Bereich der proteolytischen Spaltstelle des F<sub>0</sub>-Proteins (Collins et al., 1993) ließ die Unterscheidung virulenter Stämme von apathogenen bzw. lentogenen Isolaten zu (Tab. 1). Es wurde festgestellt, dass virulente Stämme an den Positionen 112/113 und 115/116 des F<sub>0</sub>-Proteins zwei Paare basischer Aminosäuren (Arginin (R) oder Lysin (K)) und an Position 117 Phenylalanin (F) aufweisen (Collins et al., 1994). Gering virulente Stämme hatten in diesem Bereich nur an Position 116 (Arginin (R)) und 113 (Arginin (R) oder Lysin (K)) basische Aminosäuren sowie an Position 117 Leucin (L) statt Phenylalanin (F). Die Untersuchung rekombinanter Viren bestätigte die Spaltbarkeit des F<sub>0</sub>-Proteins als hauptsächlich entscheidenden Faktor für die Virulenz von APMV-1 (Peeters et al., 1999).

Das Wissen über die Sequenzunterschiede an der proteolytischen Spaltstelle des F<sub>0</sub>-Proteins dient als Grundlage für die meisten molekularen Nachweis- und Differenzierungstechniken. Diese Techniken beruhen aufgrund des RNA-Genoms von APMV-1 meist auf einer Polymerasekettenreaktion nach vorheriger Reverser Transkription (RT-PCR). Die erste APMV-1-spezifische RT-PCR wurde von Jestin und Jestin (1991) entwickelt. Die Autoren benutzten universelle Primer, die 238 Ns des F-Gens amplifizierten. Ausgangsmaterial war dabei virushaltige Amnio-Allantois-Flüssigkeit (AAF). In vielen Ansätzen werden die generierten PCR-Produkte zur weiteren Charakterisierung verwendet, z.B. durch:

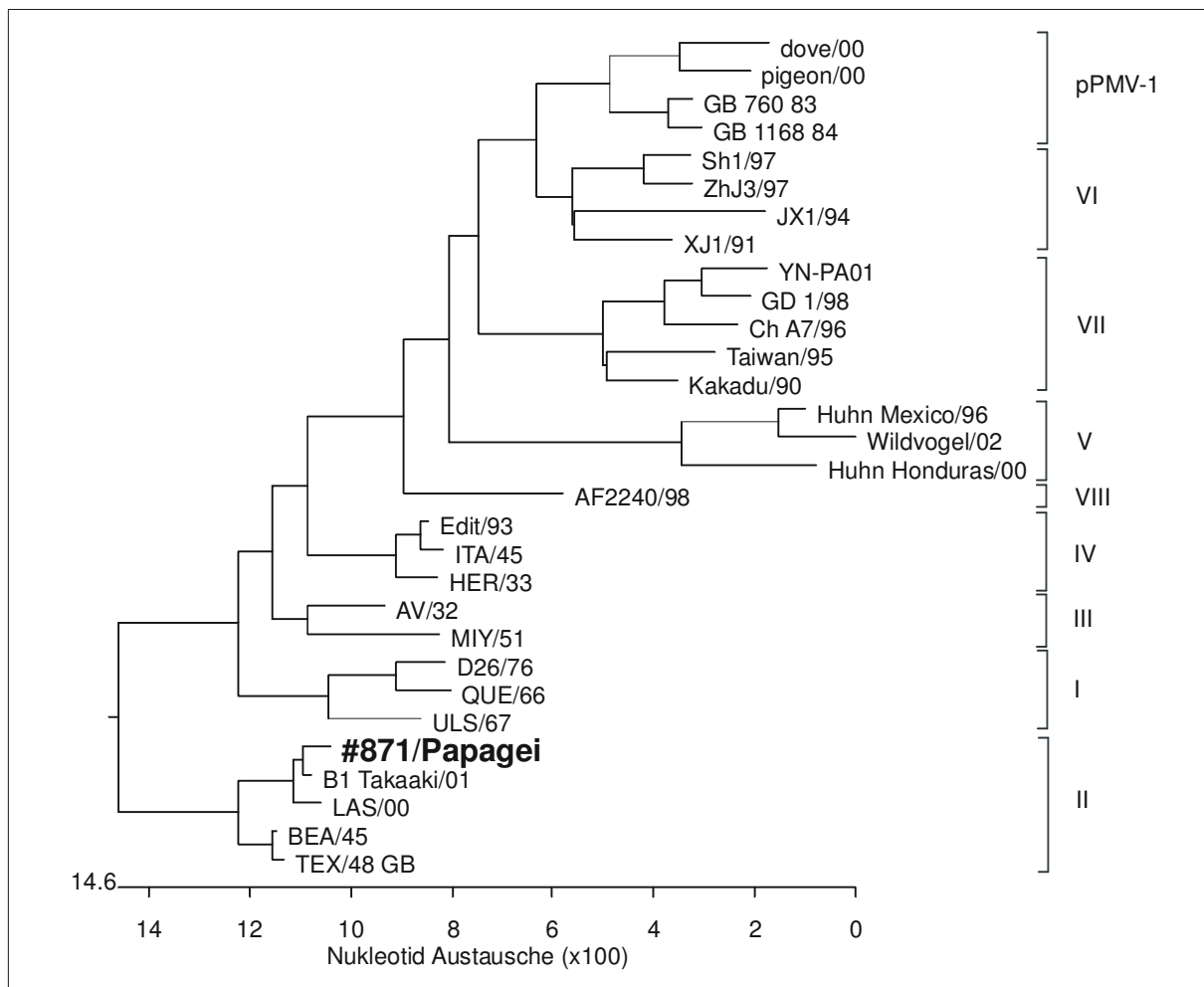
- a) Restriktionsenzymanalyse (Ballagi-Pordany et al., 1996; Lomniczi et al., 1998; Herczeg et al., 1999, 2001; Nanthakumar et al., 2000; Wehmann et al., 1997)
- b) Sondenhybridisierung (Aldous et al., 2001; Jarecki Black und King, 1993; Li und Zhang, 2004; Oberdörfer und Werner, 1998)
- c) Sequenzierung und Analyse der Nukleinsäuresequenz (Aldous et al., 2003, 2004; Collins et al., 1993, 1994, 1996, 1998; Herczeg et al., 1999; King und Seal, 1998; Lomniczi et al. 1998; Sakaguchi et al., 1989; Seal et. al., 1995, 1996a, 1996b, 1998, 2000a, 2002, 2004; Toyoda et al., 1989).

Kant et al. (1997) verwendeten bei einer RT-hemi-nested PCR in der zweiten Runde pathotyp-spezifische Primer, die durch Bindung an der F<sub>0</sub>-Protein-Spaltstelle eine Differenzierung verschiedener APMV-1-Isolate erlaubten. Eine RT-nested PCR mit anschließendem colorimetrischem Detektionssystem der Amplifikationsprodukte (RT-nested PCR ELISA) konnte laut Autoren die Sensitivität im Vergleich zur Standard RT-nested PCR um das 100fache erhöhen (Kho et al., 2000).

Neben der Typisierung auftretender APMV-1-Stämme nach Pathogenitätsmerkmalen sind auch Einteilungen anhand antigenetischer Unterschiede sowie Vergleichen ihrer Nukleinsäuresequenzen möglich. Aufgrund dieser Einteilungen können wichtige Aussagen über die Herkunft und Verbreitung von APMV-1 getroffen werden.

APMV-1-Stämme wurden lange Zeit als antigenetisch homogene Gruppe betrachtet. Erst mit Hilfe von gegen spezifische Epitope auf Virusproteinen gerichteten monoklonalen Antikörpern (mAk) war eine antigenetische Differenzierung unterschiedlicher APMV-1-Stämme möglich (Abenes et al., 1986; Erdei et al., 1987; Ishida et al., 1985; Jestin et al., 1989a; Lana et al., 1988; Meulemans et al., 1987; Nishikawa et al., 1987; Russel und Alexander, 1983; Srinivasappa et al., 1986). Dadurch können spezifische Viren identifiziert werden. So sind z.B. mAk beschrieben, die zwischen den Impfstämmen B1 und LaSota unterscheiden (Erdei et al., 1987; Meulemans et al., 1987) bzw. Impfstämme von Feldvirusstämmen differenzieren (Srinivasappa et al., 1986). Untersuchungen mit mAk identifizierten erstmals den Erreger der Paramyxovirose der Tauben als APMV-1 vom Taubentyp (pPMV-1; Alexander et al., 1987; Collins et al., 1989; Jestin et al., 1989; Pearson et al., 1987). Die Fähigkeit der Viren mit 26 verschiedenen mAk zu reagieren (Alexander et al., 1997a) ermöglichte eine Unterteilung in insgesamt 39 Reaktionsmuster durch das Internationale Referenzzentrum für Newcastle Disease in Weybridge (UK).

Die Ermittlung von APMV-1-Nukleinsäuresequenzen und ihre Veröffentlichung in Computerdatenbanken ermöglichen einen Vergleich von APMV-1-Sequenzdaten mit phylogenetischer Analyse. So gruppieren APMV-1-Stämme mit gemeinsamen zeitlichen oder geographischen Eigenschaften bei diesen Analysen meist in die gleiche Gengruppe. Phylogenetische Analysen der Nukleinsäuresequenzen beruhen dabei häufig auf der Sequenz des F-Gens (Abolnik et al., 2004; Aldous et al., 2003, 2004; Alexander et al., 1999; Chambers et al., 1986; Herczeg et al., 1999, 2001; Houvilainen



**Abb. 4. Phylogenetisches Dendrogramm von APMV-1-Isolaten.** Die Analyse beruht auf einem Fragment des F-Gens (Ns-Position 4745 bis 6191). Die genutzten Sequenzen wurden der NCBI-Datenbank entnommen und sind im Methodenteil (Tab. 5) aufgeführt. #871/Papagei aus Grund und Goltz, 2001.

et al., 2001; Ke et al., 2001; Liang et al., 2002; Lomniczi et al., 98; Mase et al., 2002; Wehmann et al., 2002; Yang et al., 1999; Yu et al., 2001). Aber auch andere Genabschnitte, v.a. des HN- und M-Gens (Barbezange und Jestin, 2003; Lin et al., 2003; Millar et al., 1988; Panshin et al., 2000a, 2000b; Sakaguchi et al., 1989; Seal , 96a, 2004; Seal et al., 96b, 98; Wemers et al., 1987), wurden phylogenetisch analysiert und ermöglichten die Einteilung von APMV-1 Stämmen in acht Gengruppen (Alexander et al., 1999; Herczeg et al., 1999, 2001; Ke et al., 2001; Liang et al., 2002; Lomniczi et al., 98; Yang et al., 1999; Yu et al., 2001), von denen vor allem die Gengruppen VI und VII verschiedene Untergruppen aufweisen. Aldous et al. (2003)

fassen die Gengruppen III, IV, V und VIII als Untergruppen der Gengruppe III auf und beschreiben insgesamt sechs Gengruppen. Die vorliegende Arbeit stützt sich auf die frühere Einteilung und bezeichnet außerdem pPMV-1-Isolate, die in anderen Arbeiten der Gengruppe VI oder VII (Aldous et al., 2003: Untergruppe 4b) zugerechnet werden, als eigene Gengruppe pPMV-1 (Abb. 4).

## 2.5. Eigenschaften von APMV-1-Isolaten aus dem Rückenmark von Psittaziden

Im Zuge von Untersuchungen über die Genese der NPMD wurden aus dem Rückenmark von sechs Papageien mit pathologischen Veränderungen der NPMD APMV-1 mit geringer Virulenz isoliert (Tab. 2). Eine Sequenzierung der proteolytischen

**Tab. 2. APMV-1-Isolate aus dem Rückenmark von Papageien (Grund et al., 2002)**

Isolat	Spezies	Alter <sup>1</sup>	Geschlecht <sup>2</sup>	Tod <sup>3</sup>
#472	Kea ( <i>Nestor notabilis</i> )	adult	W	ge
#599	Kongo Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	1 J	M	ge
#624	Kongo Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	adult	W	eu
#625	Marakana ( <i>Ara maracana</i> )	4 J	M	eu
#626	Gelbhaubenkakadu ( <i>Cacatua galerita</i> )	adult	M	ge
#871	Kongo Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	adult	W	ge

1 J: Jahre;                      2 M: männlich; W: weiblich;                      3 eu: euthanasiert; ge: gestorben

Spaltstelle des F0-Proteins dieser Papageien-APMV-1-Isolate ergab die gleiche Nukleinsäuresequenz wie bei den Hühnerimpfstämmen LaSota und B1 (Tab.1; Grund et al., 1998). Zudem wiesen sie gegenüber dem Hühnerimpfstamm B1 eine verringerte Virulenz in ovo auf (Grund et al., 2002). Die Papageien-APMV-1-Isolate ließen sich durch eine fehlende Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper 7D4 (Meulemans et al., 1987) sowie aufgrund der hohen Thermosensitivität ihres HN-Proteins (Hanson und Spalatin, 1978) und der schnellen Elutionsrate (Spalatin et al., 1970) von dem Impfstamm LaSota, aber nicht vom Impfstamm B1 abgrenzen (Grund et al, 2002). Bei Langzeituntersuchungen von natürlich und experimentell APMV-1 infizierten Graupapageien (*Psittacus erithacus*) konnte eine Persistenz des Erregers über einen

---

langen Zeitraum nachgewiesen werden (Grund, 2004). Trotz Erregerausscheidung eines experimentell infizierten Graupapageis kam es dabei nicht zu einer Übertragung auf ein mit diesem über 89 Wochen vergesellschaftetes Sentineltier (Grund, 2004). Erste Vergleiche des von Grund et al. (1998) veröffentlichten Abschnitts des F-Gens von Papageien-APMV-1 Isolat #871 mit Nukleinsäuresequenzen von APMV-1-Stämmen aus allen Gengruppen ergaben bei phylogenetischen Analysen eine Gruppierung in die Gengruppe II mit den Impfstämmen LaSota und B1 (Abb. 4; eigene Untersuchungen).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Verwendete Virusstämme und Immunsera**

##### **3.1.1. Virusstämme**

Die Untersuchungen wurden mit sechs Papageien-APMV-1-Feldisolaten (#472, #599, #624, #625, #626 und #871) aus dem Rückenmark von Papageien mit klinischen und pathologisch-anatomischen Anzeichen der NPMD (Grund et al., 2002) durchgeführt. Als Referenzen dienten LaSota (Nobilis<sup>®</sup> ND LaSota; Fa. Intervet, lentogen, virushaltige AAF; Hanson und Brandy, 1955), B1 (Nobilis<sup>®</sup> ND Hitchner, Fa. Intervet; lentogen, virushaltige AAF; Hitchner, 1975), P201 (Nobilis<sup>®</sup> Paramyxo P201, Fa. Intervet, Formaldehyd-inaktivierter Ölemulsionsimpfstoff), Ulster (Nationales Referenzlabor für Newcastle Disease, Riems, lentogen, virushaltige AAF; Waterson et al., 1967), R72/95 (pPMV Feldisolat von einer Taube; Fa. Intervet, virushaltige AAF), #7780 (pPMV Feldisolat von einer Taube, Institut für Geflügelkrankheiten, virushaltige AAF), #8226 (APMV-1 Feldisolat von einer Taube, Institut für Geflügelkrankheiten, virushaltige AAF).

##### **3.1.2. Immunsera**

Die verwendeten  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren wurden durch Immunisierung von adulten SPF Tauben mit den sechs Papageien-APMV-1-Isolaten #472, #599, #624, #625, #626 und #871 hergestellt.

Die  $\alpha$ -pPMV-1-Seren wurden nach einfacher Inokulation von Brieftauben (*Columba livia var. dom.*) mit dem pPMV-1 Feldisolat R72/95 gewonnen (Schmellekamp, 2005).

Das  $\alpha$ -LaSota-Hyperimmunserum wurde durch mehrfache Immunisierung eines Haushuhnes (*Gallus gallus var. dom.*) mit aufgereinigtem und inaktiviertem APMV-1-LaSota hergestellt (Grund et al., 2002).

### 3.2. Haltung von SPF Tauben und Gewinnung von $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren

Für die Gewinnung von  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren wurden 12 spezifiziert pathogenfreie (SPF) Texanertauben (*Columba livia var. dom.*) aus eigener Nachzucht herangezogen. Die Gewinnung der Seren bedurfte gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes keiner Genehmigung durch die zuständige Behörde. Sie wurde gemäß § 8a des Tierschutzgesetzes unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531.6-1/02 spätestens zwei Wochen vor Beginn angezeigt.

Bei der Einnistung fand eine klinische Überprüfung des Gesundheitszustandes aller Tiere statt. Die SPF-Tauben wurden während der ersten zehn Tage des Untersuchungszeitraumes unter konstanten Klimabedingungen in einem volierenartigen Isolationsstall mit Unterdruck-Belüftung und gefilterter Abluft gehalten und anschließend für den Rest des Untersuchungszeitraumes in Einzelkäfigen unter den gleichen Bedingungen untergebracht. Die gründliche Nassreinigung des Stalles mit anschließender Desinfektion schloss sich nach jeder Umstallung der Tauben in Einzelkäfige an. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit kommerziellem pelletiertem Futter (all-mash R, Fa. Deuka) und die Wasserversorgung wurde über Stülptränken gewährleistet.

Vor der Inokulation wurde das Serum aller Tiere im HAH auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen APMV-1 (LaSota) untersucht. Jeweils zwei Tauben pro Papageien-APMV-1-Isolat wurden mit 1 ml virushaltiger AAF, die zuvor mit steriler PBS auf  $10^7$  EID<sub>50</sub>/ml verdünnt worden war, inokuliert. Die Injektion erfolgte in den tiefen Brustmuskel. Nachdem bei den Tauben, die mit den Papageien-APMV-1 Isolaten #599, #624 und #626 inokuliert worden waren 7, 14 und 21 Tagen p.i. im HAH keine Antikörper gegen APMV-1 (LaSota) festgestellt werden konnten, wurde bei allen Tieren eine zweite Inokulation 21 Tage p.i. durchgeführt (Tab. 3). Vor dieser zweiten Inokulation sowie 28 Tage p.i. wurden Blutentnahmen für die serologische Antikörper-Bestimmung durchgeführt. Blut für serologische Untersuchung auf APMV-1-Antikörper wurde den Tieren durch Punktion der Vena cutanea ulnaris (Korbel und König, 2001) entnommen. Dabei wurde jeweils ein Volumen (ml) entnommen, das maximal 1 % des Körpergewichtes (in g) entsprach. Eine Serokonversion erfolgte 7 Tage nach der

**Tab. 3: Versuchsablauf bei der Gewinnung von  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren**

Tag p.i.	Maßnahme	Papageien-APMV-1-Isolate <sup>1</sup>					
		#472	#599	#624	#625	#626	#871
0	Blutentnahme ("Nullserum")	x	x	x	x	x	x
0	1. Inokulation	x	x	x	x	x	x
7	Blutentnahme A		x	x		x	
10	Umstellung in Einzelkäfige	x	x	x	x	x	x
14	Blutentnahme B		x	x		x	
21	Blutentnahme C		x	x		x	
21	2. Inokulation	x	x	x	x	x	x
28	Blutentnahme D	x	x	x	x	x	x
35	Sektion/Serumgewinnung	x	x	x	x	x	x
1	Jeweils 2 Tauben pro Isolat						

zweiten Inokulation. Die für die Charakterisierung benutzten Seren stammen deshalb vom 35. Tag p.i., an dem die Sektion mit pathologisch-anatomischer Beurteilung erfolgte. Dabei wurden die Tauben nach Betäubung durch Blutentzug getötet. Das Blut wurde aufgefangen und davon nach Koagulation durch niedertourige Zentrifugation (800 x g/15 Min.; Beckmann® TY-JS 4.2) das Serum gewonnen. Dieses wurde portioniert bei – 20 °C eingefroren und stand für die serologischen Untersuchungen zur Verfügung.

Die mit verschiedenen APMV-1-Isolaten infizierten SPF-Tauben zeigten klinisch zu keinem Zeitpunkt Krankheitssymptome. Die pathologisch-anatomische Untersuchung war bei allen inokulierten Tauben unauffällig. Bei der bakteriologischen Untersuchung wurden keine pathogenen Keime nachgewiesen. Auch die virologische Untersuchung war negativ. Die Anzucht von APMV-1 aus Nierenproben der inokulierten Tiere in der Eikultur war nicht möglich.

### 3.3. Hämagglutinations-Hemmungs-Test

Der Hämagglutinations Hemmungstest (HAH) wurde gemäß der Richtlinie 92/66/EWG des Rates vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der



Newcastle Krankheit (92/66/EWG) durchgeführt. Das zu testende Serum wurde bei 56°C für 30 Min. hitzebehandelt und in einem zweifach Ansatz in V-förmigen Mikrotiterplatten in Zweierstufen mit PBS verdünnt. Zu 25 µl einer entsprechenden Serumverdünnung wurden anschließend jeweils 25 µl einer Virussuspension mit 4 hämagglutinierenden Einheiten gegeben. Nach Durchmischung und Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur, erfolgte die Zugabe von jeweils 50 µl einer Hühnererythrozyten-Suspension (1 %). Als Serumkontrolle für eine Autoagglutination diente die erste Serumverdünnung, der kein Antigen zugesetzt wurde. Weitere Kontrollen umfassten ein bei jedem Ansatz mitgeführtes APMV-1-positives Referenzserum sowie die Titration des verdünnten Antigens und eine Erythrozytenkontrolle. Nach Durchmischung und Sedimentation für 30 Min. bei Raumtemperatur wurde das Ergebnis abgelesen. Die höchste Serumverdünnung, bei der die virusinduzierte Erythrozytenagglutination gehemmt war, wurde als HAH-Titer angegeben.

Zwölf α-Papageien-APMV-1-Seren und zwei α-pPMV-1-Seren sowie ein α-LaSota-Hyperimmunserum wurden gegen die sechs Papageien-APMV-1-Antigene, B1, LaSota und P201 jeweils zweimal im HAH getestet. Von den dabei ermittelten Antikörpertitern wurde der Mittelwert als Ergebnis verwendet und in log 2 angegeben.

### **3.4. Hämagglutinations-Test**

Für die Titration und Verdünnung der Antigene zur Benutzung im HAH sowie zur Untersuchung von in der Eikultur angezüchtetem Probenmaterial wurde der Hämagglutinations-Test (HA) gemäß der Richtlinie 92/66/EWG des Rates vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle Krankheit (92/66/EWG) durchgeführt. In einem Zweifachansatz wurde die zu testende Flüssigkeit in V-förmigen Mikrotiterplatten in Zweierstufen mit PBS verdünnt. Zu 25 µl der jeweiligen Antigenverdünnungsstufen wurden anschließend 50 µl einer Hühnererythrozyten-Suspension (1 %) gegeben. Nach Durchmischung der Lösungen und Sedimentation für 30 Min. bei Raumtemperatur wurde das Ergebnis abgelesen. Eine positive Agglutinationsreaktion lag vor, wenn es zu keiner Sedimentation der

Erythrozyten gekommen war bzw. das gebildete Erythrozyten-Sediment nach Kippung der Platte um ca. 60° nicht verlief. Die letzte Antigenverdünnung bei der eine Agglutination zu beobachten war, wurde reziprok als HA-Titer gewertet. Bei jedem Ansatz wurde inaktiviertes APMV-1 (McCollum und Brandly, 1955), Stamm LaSota, als Referenzantigen mitgeführt sowie PBS für eine Erythrozytenkontrolle.

### 3.5. RT-PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte

#### 3.5.1. RT-PCR

Für die Amplifikation von Teilen des Genoms der sechs Papageien-APMV-1-Isolate wurden 5 überlappende Primerpaare (Tab. 4; siehe auch Abb. 5) in RT-PCRs verwendet. Für die Auswahl aller Primer wurde das Programm PrimerSelect der Lasergene Software (Fa. DNA-Star Inc., Madison) verwendet. Alle Primer wurden bei der Firma metabion GmbH (Martinsried) hergestellt und anschließend mit sterilem Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) behandeltem Aqua bidest. auf eine Konzentration von 100 pmol/ µl gebracht.

**Tab. 4: Verwendete Primer für RT-PCR und RT-nested PCR**

Primer Name	Bindungs-Position <sup>1</sup>	Oligonukleotid-Sequenz
FHN1A sense	5953 - 5976	5'-CAA CAA YTC RAT CAG YAA TGC YTT -3'
FHN1A antisense	6610 - 6637	5'-AAC CAA GTG WAG ATG TAA TCT TTT CTT C-3'
FHN3A sense	6389 - 6410	5'-TTC ACC GAC AAC AGT CCT CAA T-3'
FHN3A antisense	7073 - 7094	5'-TTG ATG GAA CGC AGA GTA GAA A-3'
HN1A sense	6816 - 6839	5'-GAT AGG CAA AGA ACT CAT TGT AGA-3'
nested HN1A sense	6895 - 6915	5'-TTT ATC CCG GCG CCT ACT ACA-3'
nested HN1A antis.	7311 - 7334	5'-ATA AAA GAT CCA CCC CCT ACT CCT-3'
HN1A antisense	7532 - 7555	5'-AGG ATG TTG ACA CCT TGA TAG ATA-3'
HN2A sense	7352 - 7375	5'-TCT CAG TCT ACG GAG GGC TAA AAC-3'
HN2A antisense	8081 - 8104	5'-TCT CAA CTA GTA ACG GGA CGA TTC-3'
HN4A sense	7958 - 7981	5'-GAG TGA GTT CAA GCA GTA CCA AAG-3'
HN4A antisense	8656 - 8679	5'-TTA GCC AGT TCT TCT AAA CAC CTG-3'

<sup>1</sup>Bezogen auf die Position im Gesamt-Genom von LaSota (Römer-Oberdörfer, 1999)

Die Isolierung viraler RNA sowie die folgende RT-PCR-Reaktion erfolgte zeitlich getrennt für die zu untersuchenden Isolate. Dabei wurde pro Ansatz 140 µl virushaltige

Amnion-Allantois-Flüssigkeit eingesetzt. Aufgereinigt wurde die RNA mit Hilfe des QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit Systems (Fa. Qiagen, Valencia USA) nach Herstellerangaben. Eluiert wurde die Säule mit 2 x 40 µl AVE-Puffer. Die folgenden Schritte der RT-PCR wurden im Thermocycler Cyclone 96 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der RNA-Präparation mit 0,5 µl des jeweiligen „sense“-Primers gemischt. Nach Entfaltung der RNA-Sekundärstruktur bei 65°C für 30 Min. und Primeranlagerung (55°C, 15 Min.) erfolgte die Zugabe der Komponenten für die RT (42°C, 60 Min.). Für die Amplifikation in der PCR wurde die entstandene cDNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das bereits die Reaktionskomponenten vorgelegt waren. Nach initialer Inkubation für 94°C für zwei Min. folgte die eigentliche PCR, die 35 Zyklen umfasste (94°C, 30 Sekunden; 55°C, 30 Sekunden; 72°C, 1 Min.), wobei die finale Elongation (72°C) 7 Min. dauerte.

### Reaktionskomponenten für die RT-PCR

#### RT-Ansatz

- RT-Enzympuffer (5x) 4,00 µl
- RNasin Rnase Inhibitor [40 U/µl] 0,50 µl  
(Promega, Madison WI, USA)
- Reverse Transcriptase AMV, [24 U/µl] 0,75 µl  
(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- PCR Nucleotide Mix, [10 mM] 2,00 µl  
(Promega, Madison WI, USA)
- Dithiothritol (DTT) [0,1 M] (Merck, Darmstadt) 2,00 µl
- Aqua bidest., steril, DEPC-behandelt ad 9,50 µl

#### PCR-Ansatz

- Template (cDNA Lösung aus RT), 5,00 µl
- Aqua bidest., steril, DEPC-behandelt 36,00 µl
- PCR buffer 10 x, mit MgCl<sub>2</sub> 5,00 µl  
(Expand High Fidelity, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Taq-DNA-Polymerase [3,5 U/µl] 0,50 µl  
(Expand High Fidelity, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

- PCR Nucleotide Mix [10 mM] (Promega, Madison WI, USA,) 1,00 µl
- Dimethylsulfoxid (DMSO) [3 %] (SIGMA, St.Louis, USA) 1,50 µl
- Primer [100 pmol/ µl] je 0,50 µl

### 3.5.2. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die PCR-Produkte wurden in 2 %igem Agarosegel (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Ethidium-Bromid- (Fa. Roth) Färbung (Sambrook et al., 1989) überprüft und anschließend, nach Entfernen der Primer mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Valencia USA) nach Herstellerangaben, bei der Fa. Sequiserve (Vaterstetten) mit einem ABI Prism 3730 Kapillarsequenziergerät in 3'- und in 5'-Richtung sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme SeqMan und EditSeq der Lasergene Software (Fa. DNA-Star Inc., Madison) bearbeitet. Sequenzen anderer APMV-1-Stämme stammen von der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, siehe Tab. 5). Für die primäre Ausrichtung der zu vergleichenden Sequenzen mit dem Programm MegAlign der Lasergene Software (Fa. DNA-Star Inc., Madison) wurde die Clustal-V-Methode (Higgins und Sharp, 1989) mit Standardeinstellungen verwendet. Nach Abgleichung der Sequenzen auf eine einheitliche Länge wurde die finale Ausrichtung der Clustal-W-Methode (Thompson et al., 1994) mit Standardeinstellungen durchgeführt. Diese Ergebnisse waren Grundlage für die Erstellung der phylogenetischen Dendrogramme und weiterführender Analysen.

**Tab. 5: Für Analysen und Vergleiche verwendete APMV-1-Sequenzen**

APMV-1 Isolat Abkürzung	Gen- gruppe	NCBI Zugangs-Nummer		
		F-Gen	HN-Gen	L-Gen
3.91/98	VI		Y17341	
AF2240/94	VIII	AF048763	X79092	AY262106
ASTR/74	VI		AJ243382	
AV/32	III	M24700	M24712	AY505056
B1 (Jorgensen)	II		M16573	

**Tab. 5: Fortsetzung**

APMV-1 Isolat Abkürzung	Gen- gruppe	NCBI Zugangs-Nummer		
		F-Gen	HN-Gen	L-Gen
B1 (Sakaguchi/Toyoda)	II	M24695	M24708	
B1 (Sellers)	II	AF309418	AF309418	
B1 SEPRL	II		U37193	
B1 Takaaki/01	II	AF375823	AF375823	AF375823
B1 Vacc. 1	II		U37187	
B1 Vacc. 5	II		U37191	
B1 Vacc. 6	II		U37192	
BEA/45	II	M24697	X04355	X05399
Ch A7/96	VII	AY028995		
CHI/85	VII		M24716	
D26/88	I	M24692	M19432	
dove/00	pPMV-1	AY288995	AY288995	AY562989
Edit/93	IV	X71995	X71994	
GB 760 83	pPMV-1	AF109885		
GB 1168 84	pPMV-1	AF109885		
GD 1/98	VII	AF456437	AF456433	
HB V4/92	II		AY225110	
HER/33	IV	M24702	M24714	AY741404
Huhn Mexiko/96	V	AY288999	AY288999	AY505067
Huhn Honduras/00	V	AY288993	AY288993	
ITA/45	IV	M17710	M24715	
JX1/94	VI	AF458021		
Kakadu/90	VII	AF015508	AF542842	AY562985
Kansas/00	II		AF212323	
LAS/99 (Rö.-Ober.)	II	Y18898	Y18898	Y18898
LAS (de Leeuw)	II		AF077761	
LAS Vacc. Russ.	II		AJ243386	
LAS (Sagrera)	II		AF098289	
LAS (Sakaguchi/Toyoda)	II	M24696	M24709	
LAS Vacc. 2	II		U37188	
LAS Vacc. 4	II		U37190	
MET/95	II		AY143159	
MIY/51	III	M24701	M24713	
NDVCUL/97	II		AY359877	
NL/96	VII		AF204872	
pigeon/00	pPMV-1	AY288996	AY288996	AY505061
QUE/66	I	M24693	M24706	
SAH/85	II		AJ243384	

**Tab. 5: Fortsetzung**

APMV-1 Isolat Abkürzung	Gen- gruppe	NCBI Zugangs-Nummer		
		F-Gen	HN-Gen	L-Gen
Sh1/97	VI	AF458018		
Taiwan/95	VII	U62620	U62620	
TEX/48 GB	II	M24698	M21409	AY505057
Timney/90		AF015513		
ULS/67	I	M24694	M24707	AY562991
Wildvogel/02	V	AY562987	AY562987	
XJ1/91	VI	AF458020		
YN-PA/01	VII	AY253912	AY253912	
ZhJ3/97	VI	AF458015		
zj/2000	II		AY135171	

### 3.6. Versuche zur Sensitivitätsbestimmung der RT-(nested) PCR

Für die Sensitivitätsbestimmung der RT-PCR und RT-nested PCR wurde virushaltige (Papageien-APMV-1-Isolat #624) AAF ( $1,37 \times 10^9$  EID<sub>50</sub>/ml) mit PBS in 10er Verdünnungsstufen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-10}$  verdünnt. Je 100 µl der verdünnten AAF wurden mit 0,9 g PBS bzw. 0,9 g elektronenmikroskopisch PMV-negativem Papageienkot vermischt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. 0,5 g des Gemischs wurden mit 4,5 ml PBS versetzt und durch Vortexen mit Glasperlen homogenisiert. Es erfolgte eine Sedimentation der groben Bestandteile durch Zentrifugation (464 x g/10 Min.; Beckmann® TY-JS 4.2). 140 µl des Überstandes wurden für die RNA-Isolierung eingesetzt.

Die RNA-isolierung erfolgte mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA) nach Herstellerangaben. Eluiert wurde die Säule mit 60 µl AVE-Puffer.

Zum Vergleich wurde der peqGOLD RNA Pure™ FL Kit nach Herstellerangaben getestet. Das dabei entstandene Pellet wurde in 60 µl DEPC-behandeltem sterilem Aqua bidest. gelöst. Die anschließende RT-PCR wurde mit dem Primerpaar HN1A wie oben beschrieben durchgeführt (für RT-nested PCR: siehe 3.7.).

### 3.7. RT-nested PCR

Die Kotproben wurden mit Glasperlen unter Zusatz von PBS in einem Verhältnis von ca. 1:2 (Vol/Vol) durch Vortexen homogenisiert. Nach Sedimentation der groben Bestandteile durch Zentrifugation (464 x g /10 Min.; Beckmann® TY-JS 4.2) wurde der Überstand für die RNA-Extraktion mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Eluiert wurde die Säule mit 60 µl AVE-Puffer. Die RT-nested PCR wurde im Thermocycler Cyclone 96 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Dazu wurden 9,5 µl der RNA-Präparation mit 0,5 µl des äußeren HN1A „sense“-Primers (100 pmol/µl) gemischt. Nach Entfaltung der RNA-Sekundärstruktur bei 70°C für 5 Min. und anschließender Abkühlung auf Eis, erfolgte die Zugabe der Komponenten für die RT (52°C, 60 Min.) mit anschließender Inaktivierung (70°C, 15 Min.). Für die Amplifikation mit dem Primerpaar HN1A wurde die entstandene cDNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das bereits die Reaktionskomponenten vorgelegt waren. Nach initialer Denaturierung bei 94°C für zwei Min. folgte die eigentliche PCR, die 35 Zyklen umfasste (95°C, 1 Min.; 53,5°C, 30 Sekunden; 73°C, 105 Sekunden) und die finale Elongation (72°C, 5 Min.). Für die Amplifikation mit den inneren (nested HN1A; Tab. 4) Primern wurde das Produkt aus der ersten PCR-Runde 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt und wiederum 5 µl in die gleiche PCR mit den inneren Primern (nested HN1A) und einer Temperatur zur Primeranlagerung von 55°C statt 53,5°C eingesetzt.

#### Reaktionskomponenten für die RT-nested PCR

##### RT-Ansatz

- |  |         |
|--|---------|
| - RT-Enzympuffer (5x)  | 5,00 µl |
| - RNasin Rnase Inhibitor [40 U/µl]<br>(Promega, Madison WI, USA)                                   | 0,50 µl |
| - M-MLV Reverse Transcriptase Rnase H Minus,<br>Punktmutante [200 U/µl] (Promega, Madison WI, USA) | 0,25 µl |
| - PCR Nucleotide Mix, [10 mM]<br>(Promega, Madison WI, USA)  | 1,25 µl |
| - Aqua bidest., steril, DEPC behandelt   | 8,00 µl |

### PCR-Ansätze

- Template (cDNA Lösung aus RT bzw. 1. Runde PCR)	5,00 µl
- Aqua bidest., steril, DEPC behandelt	37,50 µl
- PCR Puffer 10 x, mit MgCl <sub>2</sub>	5,00 µl
- Pfu DNA Polymerase [3 U/µl] (Promega, Madison WI, USA,)	0,50 µl
- PCR Nucleotide Mix [10 mM] (Promega, Madison WI, USA)	1,00 µl
- Primer [100 pmol/ µl]	je 0,50 µl

Die Ergebnisse der RT-nested PCR-Produkte wurden im 2 % Agarosegel (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Ethidium-Bromid- (Fa. Roth) Färbung (Sambrook et al., 1989) überprüft und beurteilt.

Sowohl bei der RT-PCR als auch bei der RT-nested PCR wurden umfangreiche Sicherheitsvorkehrungen getroffen, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. So wurde stets eine Negativkontrolle (DEPC-behandeltes Aqua bidest.) und eine Positivkontrolle (APMV-1-Stamm Ulster, virushaltige AAF) mitgeführt. Die Zusammenstellung der Reaktionskomponenten für die RT und PCR fand in einem getrennten Raum von der Eingabe der RNA/cDNA statt. Bei der RT-nested PCR wurden die Produkte der ersten PCR-Runde wiederum getrennt davon verdünnt. Die Analyse der PCR-Produkte wurde in einem weiteren unterschiedlichen Raum durchgeführt. In jedem Raum wurden eigene Materialien verwendet und es wurde mit Aerosol-undurchlässigen Pipettenspitzen gearbeitet.

### 3.8. Virusisolierung und Virusvermehrung

Die Virusanzucht und -vermehrung erfolgte mittels embryonierter SPF Hühnereier (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven) nach Standardmethoden (Alexander, 1989; 92/66/EWG). Kotproben wurden wie für die RT-nested PCR beschrieben mit PBS homogenisiert. Nach Zugabe von Antibiotikum (250 IE Penicillin G/ml und Dihydrostreptomycin 0.250 mg/ml) und Inkubation für eine Stunde bei



Raumtemperatur mittels 22 G Nadel (0,7 x 30 mm) wurde jeweils 0,2 ml des Überstandes in die Allantoishöhle von drei neuntägig bebrüteten SPF-Eiern appliziert. Bei jeder Anzucht wurden darüber hinaus als Kontrolle drei mit PBS inokulierte Eier mitgeführt. Die Eier wurden bei 37°C für sechs Tage inkubiert, wobei täglich abgestorbene Eier entfernt wurden. Nach Abkühlung für eine Stunde bei – 20°C wurde die Amnion-Allantois-Flüssigkeit (AAF) steril entnommen. Die von drei Eiern vereinigte AAF wurde anschließend im Hämagglutinations-Test (HA) (siehe dort) auf hämagglutinierende Eigenschaften untersucht. Darüber hinaus wurden die Embryonen sowie die Chorio-Allantois-Membranen makroskopisch beurteilt. Für weitere Passagen wurde die gewonnene AAF wie oben beschrieben verimpft. Eine abschließende Beurteilung negativer Proben erfolgte nach vier Passagen.

### **3.9. Viruspräparation für Elektronenmikroskopie und RT-nested PCR**

Für die Aufreinigung des Virus aus Kotproben eines experimentell infizierten Graupapageien (GP2) und eines Gelbbrustaras (GA) wurde Kot gesammelt, der bis zur Aufreinigung bei – 70°C gelagert wurde. Zum Vergleich wurde virushaltige (Papageien-APMV-1-Isolat #599) AAF verwendet, die vier Tage nach Allantoishöhlen-Beimpfung von SPF-Hühnereiern gewonnen wurde. Die Viruspräparation erfolgte über zwei sukzessive Saccharosegradienten. Nach Homogenisierung der Kotprobe (ca. 50 ml [Vol/Vol]) mit Glasperlen unter Zusatz von PBS in einem Verhältnis von ca. 1:2 (Vol/Vol) durch Vortexen wurden grobe Bestandteile durch Zentrifugation (464 x g / 30 Min.; Beckmann® TY-JS 4.2) sedimentiert. Anschließend erfolgte die Virussedimentation durch ein 30 %iges Saccharose-Kissen (96.500 x g/90 Min.; Sorvall® Surespin 630) und Zentrifugation in einem 20 bis 50 %igen Saccharosegradienten (96.500 x g/7 Std.; Sorvall® Surespin 630). Die drei entstandenen Banden wurden nach refraktometrischer Messung getrennt mit der Pasteurpipette abgenommen, in 1,5 ml PBS resuspendiert und jeweils auf einen zweiten 30 bis 50 %igen Saccharosegradienten aufgetragen. Nach Zentrifugation (103.000 x g/über Nacht; Beckmann® SW 55 Ti) und refraktometrischer Messung

wurden die erneut entstanden drei Banden abgenommen, mit PBS aufgefüllt und ins Pellet zentrifugiert (103.000 x g/ 90 Min.; Sorvall® Surespin 630). Das Pellet wurde in PBS gelöst und 140 µl für die RNA-Isolierung verwendet, der Rest in Einbettungs-Kapseln (EMS Beem-Capsules) erneut ins Pellet zentrifugiert (103.000 x g/ 90 Min.; Sorvall® Surespin 630) und dieses in 2,5 % Glutaraldehyd (Fa. Fluka, Neu-Ulm) für die Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie fixiert.

### **3.10. Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

#### **3.10.1. Negativkontrast**

Die Kotproben von Papageien wurden wie für die RT-nested PCR beschrieben mit PBS homogenisiert. Nach niedertouriger Zentrifugation (464 x g /10 Min.; Beckmann® TY-JS 4.2) wurde anschließend der Überstand in einem Zeiss EM 10A Elektronenmikroskop nach Negativkontrastierung mit 2 % Phosphor-Wolframsäure, pH 7.2 (Gelderblom et al., 1991) untersucht.

#### **3.10.2. Ultradünnschnitt**

Nach Aufreinigung von Kotproben und AAF durch Ultrazentrifugation über einen Saccharose-Gradienten wurden die aufgereinigten Viruspräparationen jeweils durch Zentrifugation in Einbettungs-Kapseln (Beem-Capsules, Fa. EMS) pelletiert. Nach Fixierung des finalen Pellets mit 2,5 % Glutaraldehyd (Fa. Fluka, Neu-Ulm) erfolgte die Einbettung und elektronenmikroskopische Untersuchung im Ultradünnschnitt nach Standardprotokollen (Gelderblom et al., 1988).

### 3.11. Verdünnungslösungen

#### 3.11.1. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

8,0 g NaCl	Natriumchlorid reinst (Fa.Merck, Darmstadt)
0,2 g KCl	Kaliumchlorid (Fa.Roth, Karlsruhe)
1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei	Sodium Phosphate, Dibasic, Anhydrous, A.C.S. (SIGMA, St.Louis, USA)
0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, ISO (Fa.Merck, Darmstadt)

ad 1000 ml Aqua bidest, pH 7,4, autoklaviert und bei 4 °C gelagert

#### 3.11.2. Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) Behandlung von Aqua bidest.

Zu je 500 ml Aqua bidest. wurden 0,5 ml DEPC (SIGMA, St.Louis, USA) gegeben, bei Raumtemperatur über Nacht (mindestens 8 h) inkubiert und anschließend autoklaviert (mindestens 121 °C/20 Min.). DEPC-behandeltes Aqua bidest. wurde portioniert bei - 20 °C gelagert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung von Papageien-APMV-1-Isolaten

#### 4.1.1. Serologische Differenzierung

Für die serologische Differenzierung von sechs Papageien-APMV-1-Isolaten wurden Immunsereen von Tauben verwendet, die mit je einem der Isolate (#472, #599, #624, #625, #626 und #871) und mit einem APMV-1 vom Taubentyp (R72/95) infiziert worden waren. Zusätzlich wurde ein Hyperimmunsereum eines Huhns eingesetzt, das mehrfach mit dem aufgereinigten APMV-1-Impfstamm LaSota immunisiert worden war. Klinisch wiesen die zwölf mit Papageien-APMV-1-Isolaten infizierten spezifiziert pathogenfreien (SPF) Tauben zu keinem Zeitpunkt Krankheitssymptome auf. Demgegenüber zeigte die mit APMV-1 vom Taubentyp infizierte Taube a beidseitiges Flügelzittern und Taube b zusätzlich Polyurie, Ataxie, Flugunfähigkeit und Schreckhaftigkeit (Schmellekamp, 2004).

Im Hämagglutinations-Hemmungs-Test (HAH) wiesen alle zwölf gegen Papageien-APMV-1 gerichteten Seren gegen ihr homologes Antigen Antikörpertiter von 6 bis 10 (log 2) auf (Tab. 6). Eine gleichartige Reaktion zeigten die Seren jeweils gegen die anderen fünf Papageien-APMV-1-Isolate, mit Abweichungen von höchstens 1,5 Titerstufen. So betrug z.B. der Titer von Serum  $\alpha$ -472 a sowohl gegen das Isolat #472 als auch gegen die Papageien-APMV-1-Isolate #599, #624 und #625 jeweils 7, während der gegen #626 und #871 eine Stufe niedriger war. Eine vergleichbare Reaktivität der  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren war mit B1 und LaSota zu beobachten mit Titerabweichungen vom jeweils homologen Antigen zwischen 0 bis höchstens 1,5 Stufen. Alle  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren reagierten jedoch im HAH deutlich geringer mit dem pPMV-1 Taubenimpfstamm P201. Im Vergleich zu den jeweils homologen Antigenen betrug der Unterschied zwischen zwei ( $\alpha$ -625 a und  $\alpha$ -871 b) und fünf Titerstufen ( $\alpha$ -472 a).

**Tab. 6: Unterscheidung verschiedener APMV-1 Antigene mittels Hyperimmunseren im HAH-Test**

Serum <sup>1</sup>	Antigen									
	472	599	624	625	626	871	B1	LAS	P201	
$\alpha$ -472	a	7	7	7	6	6	6	8	<2*	
	b	7	7,5	8	7	7	6	8	4*	
$\alpha$ -599	a	8	9	8	8	8	8	7,5	5*	
	b	8	9	9	8	8	8	8	5*	
$\alpha$ -624	a	7	8	7	7	6	6	7	3*	
	b	8	9	8	8	7	7	7	5*	
$\alpha$ -625	a	9	10	10	10	10	10	9	8*	
	b	8	9	8	8	7	8	8	4*	
$\alpha$ -626	a	7	7,5	7	7	6	7	6	3*	
	b	7	7,5	7,5	8	7	7	7	4*	
$\alpha$ -871	a	6	7	7	7	6	6	5	<2*	
	b	9	10	10	10	9	10	10	8*	
$\alpha$ -LAS	a	5	5,5	5	6	5	6	5,5	5	4,5
$\alpha$ -pPMV-1	a	<2*	3*	<2*	<2*	<2*	<2*	<2*	<2*	6
	b	5*	6	6	6	5*	5*	6	3*	7

<sup>1</sup> angegeben ist der Antikörpertiter des jeweiligen Serums im log 2

homologes Antigen

\* zwei oder mehr Titerstufen (log 2) Unterschied zum homologen Antigen

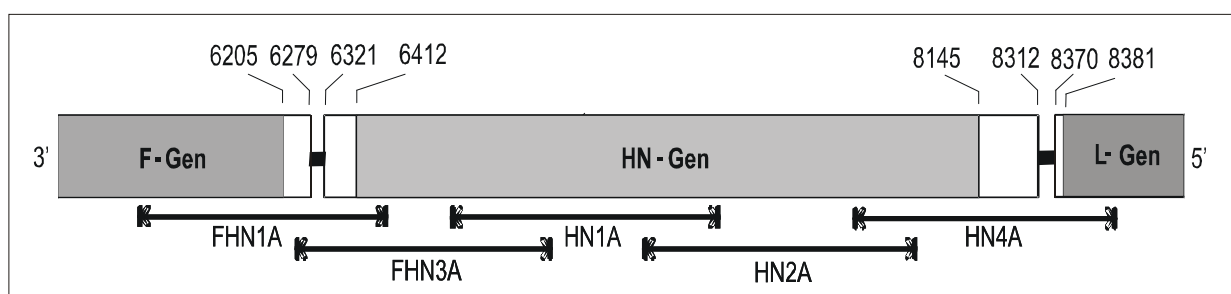
a, b Serum von Taube a/Taube b

Reziprok zu den  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren reagierte das Serum  $\alpha$ -pPMV-1 a präferentiell mit dem P201-Antigen vom Taubentyp. Während es gegen das homologe Antigen einen Titer von 6 aufwies, war der Titer gegen die Papageien-APMV-1-Isolate, B1 und LaSota um mindestens drei Stufen niedriger. Dabei differenzierte  $\alpha$ -pPMV-1 a nicht zwischen diesen Isolaten. Eine ebenso deutliche Unterscheidung war mit dem Serum  $\alpha$ -pPMV-1 b nur bei drei Papageien-APMV-1-Isolaten (#472, #626, #871) möglich und unter den untersuchten Impfstämmen unterschied sich nur der Titer gegen LaSota deutlich vom homologen Antigen.

Das  $\alpha$ -LaSota Hyperimmunserum aus einem Huhn, welches mehrfach mit aufgereinigtem und inaktiviertem Virus immunisiert worden war, wies innerhalb der untersuchten Antigene keine unterschiedliche Reaktivität auf.

#### 4.1.2. Sequenzierung von sechs Papageien-APMV-1-Isolaten

Zur weiteren Abgrenzung der Papageien-APMV-1-Isolate zu anderen APMV-1-Isolaten wurde die Nukleinsäuresequenz des HN-Gens (1992 Nukleotide (Nt)) und die abgeleitete Aminosäuresequenz untersucht. Um die intergenischen (41 bzw. 57 Nt) und nichtkodierenden Regionen in die Analyse einzubeziehen, wurde die Nukleinsäuresequenz von Position 5977 bis 8655 der genomischen Ribonukleinsäure (RNA) und damit am 3'-Ende 17 % des F-Gens (303 von 1782 Nt) und am 5'-Ende 4,3 % des L-Gens (286 von 6704 Nt) untersucht. Virale RNA wurde nach Reverser



**Abb. 5: Positionen der Fragmente, die mit einer RT-PCR amplifiziert wurden.**

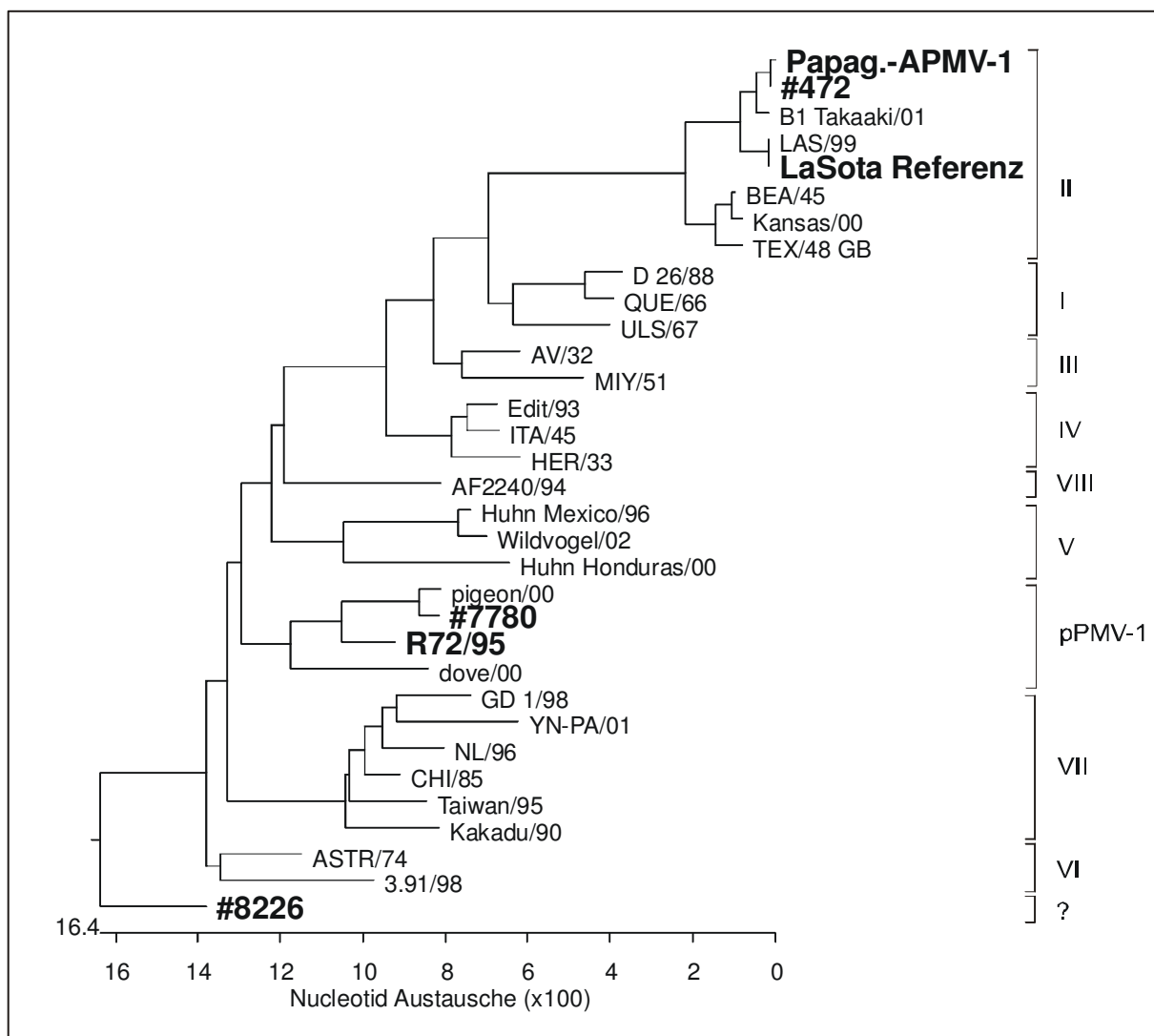
Die benutzten Primerpaare sind unten als Pfeile dargestellt. Die oberen Zahlen bezeichnen den Anfang und das Ende des jeweiligen Gens bzw. der kodierenden Sequenz (schattiert).

Transkription in einer Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) mit fünf überlappenden Primerpaaren (Abb. 5) amplifiziert. Nach Elektrophorese im Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung waren bei allen sechs Papageien-APMV-1-Isolaten sowie beim Impfstamm LaSota und einem APMV-1-Isolat vom Taubentyp (pPMV-1; R72/95) fünf Amplifikationsprodukte in der erwarteten Größe zwischen 685 und 753 Nt zu detektieren. Die Produkte wurden anschließend direkt sequenziert.

#### 4.1.2.1. Sequenzvergleich mit repräsentativen APMV-1-Stämmen

Initiale Untersuchungen eines 1239 Nt langen Fragments der kodierenden Sequenz (CDS) des HN-Gens (Position 429 bis 1669 der HN-CDS) verglichen die Papageien-APMV-1-Isolate (#472, #599, #624, #625, #626, #871) mit dem Impfstamm LaSota sowie drei Isolaten aus Tauben. Bei den Isolaten aus Tauben handelte es sich serologisch um zwei klassische pPMV-1 (R72/95, #7780) und ein APMV-1-Isolat mit einem für den Taubentyp untypischen mA<sub>k</sub>-Bindungsmuster (#8226). Die Untersuchungen zeigten eine Übereinstimmung der sechs Papageien-APMV-1-Isolate innerhalb dieses Fragments. Lediglich das Isolat #472 wies gegenüber den anderen fünf Isolaten auf Position 6848 der Gesamt-RNA einen Austausch A→G auf (0,1 % Divergenz; Tab. 7). Bei dem als Kontrolle mitgeführten Impfstamm LaSota ergab die Sequenzanalyse 0,0 % Divergenz (0 Nt Abweichung) zu einer von Römer-Oberdörfer et al. (1999) veröffentlichten Sequenz LAS/99.

Bei der phylogenetischen Analyse (Abb. 6) bestätigte sich die nach den Ergebnissen der serologischen Charakterisierung angedeutete enge Verwandtschaft der Papageien-APMV-1 zu den Impfstämmen B1 und LaSota. Ein Alignment (Position 430 bis 1668 der HN-CDS) mit repräsentativen Sequenzen ergab eine Gruppierung der Papageien-APMV-1-Isolate zu der Gengruppe II. Innerhalb dieser Gruppe wurde eine Zuordnung zu dem Impfstamm B1 (Takaaki) deutlich. Die zum Vergleich untersuchten pPMV-1 Isolate R72/95 und #7780 gruppieren zusammen mit anderen Isolaten aus Tauben in eine Gengruppe, die hier als pPMV-1 bezeichnet wird. Das Isolat #8226, welches serologisch ein für pPMV-1 untypisches Bindungsmuster der mA<sub>k</sub>s gezeigt hatte, war phylogenetisch keiner definierten Gengruppe zuzuordnen.



**Abb. 6: Phylogenetisches Dendrogramm verschiedener APMV-1-Genotypen**

Basierend auf einem 1239 Nukleotide langen Fragment der HN-CDS (Position 430 bis 1668) wurden verwandtschaftliche Beziehungen nach der Clustal-W-Methode berechnet. Die genutzten Sequenzen wurden der NCBI Datenbank entnommen und sind im Methodenteil (Tab. 5) aufgeführt.

Die Verwandtschaft der Papageien-APMV-1 wird verdeutlicht durch die Untersuchung der Divergenz bzw. Ähnlichkeit zu repräsentativen APMV-1-Sequenzen (Tab. 7). Auf der untersuchten Sequenz des HN-Gens (1239 Nt) weicht #499 von den restlichen Papageien-APMV-1-Isolaten um 0,1 % ab. Es besteht zu B1 eine Divergenz von 0,7 % sowie zu LaSota von 1,6 %. Innerhalb der Gengruppe II zeigten BEA/45 (3,6 %), Kansas/00 und TEX/48 GB (3,8 %) die größte Divergenz gegenüber den Papageien-APMV-1. Ausgeprägter ist der Unterschied zum nächsten Verwandten aus einer



anderen Gengruppe (I). So weist Isolat ULS/67 bereits 9,6 % Divergenz zu den Papageien-APMV-1 auf. Die Vergleichs-Isolate aus Tauben #8226 (17,3 %), R72/95 (18,0 %) und #7780 (18,8 %) unterscheiden sich deutlicher. Die höchste Divergenz besteht zu Isolat YN-PA/01 aus der Gengruppe VII mit 19,6 %.

**Tab. 7. Homologie der Papageien-APMV-1 mit repräsentativen APMV-1-Isolaten auf einem Teil des HN-Gens**

Isolat <sup>1</sup>	HN-Gen <sup>2</sup>		Genotyp <sup>4</sup>
	Divergenz <sup>3</sup> %	Ähnlichkeit <sup>3</sup> %	
<b>#472</b>	0.1	99.9	II
B1 Takaaki/01	0.7	99.3	II
LAS/99	1.6	98.4	II
<b>LaSota Referenz</b>	1,6	98,4	II
BEA/45	3.6	96.5	II
Kansas/00	3.8	96.4	II
TEX/48 GB	3.8	96.4	II
ULS/67	9.6	91.2	I
QUE/66	9.7	91.1	I
D 26/88	9.8	91.0	I
MIY/51	10.9	90.1	III
AV/32	11.1	89.9	III
Edit/93	12.8	88.5	IV
ITA/45	12.8	88.5	IV
HER/33	13.2	88.2	IV
ASTR/74	16.3	85.9	VI
Huhn Mexico/96	16.8	85.4	V
Wildvogel/02	17.0	85.2	V
AF2240/94	17.0	85.1	VIII
CHI/85	17.1	85.1	VII
3.91/98	17.3	85.1	VI
<b>#8226</b>	17.3	85.0	?
Taiwan/95	17.9	84.7	VII
Huhn Honduras/00	17.9	84.6	V
Kakadu/90	18.0	84.5	VII
<b>R72/95</b>	18.0	84.4	pPMV-1
dove/00	18.2	84.3	pPMV-1
GD 1/98	18.7	83.9	VII
<b>#7780</b>	18.8	83.9	pPMV-1
pigeon/00	18.9	83.8	pPMV-1
NL/96	18.9	83.8	VII
YN-PA/01	19.6	83.4	VII

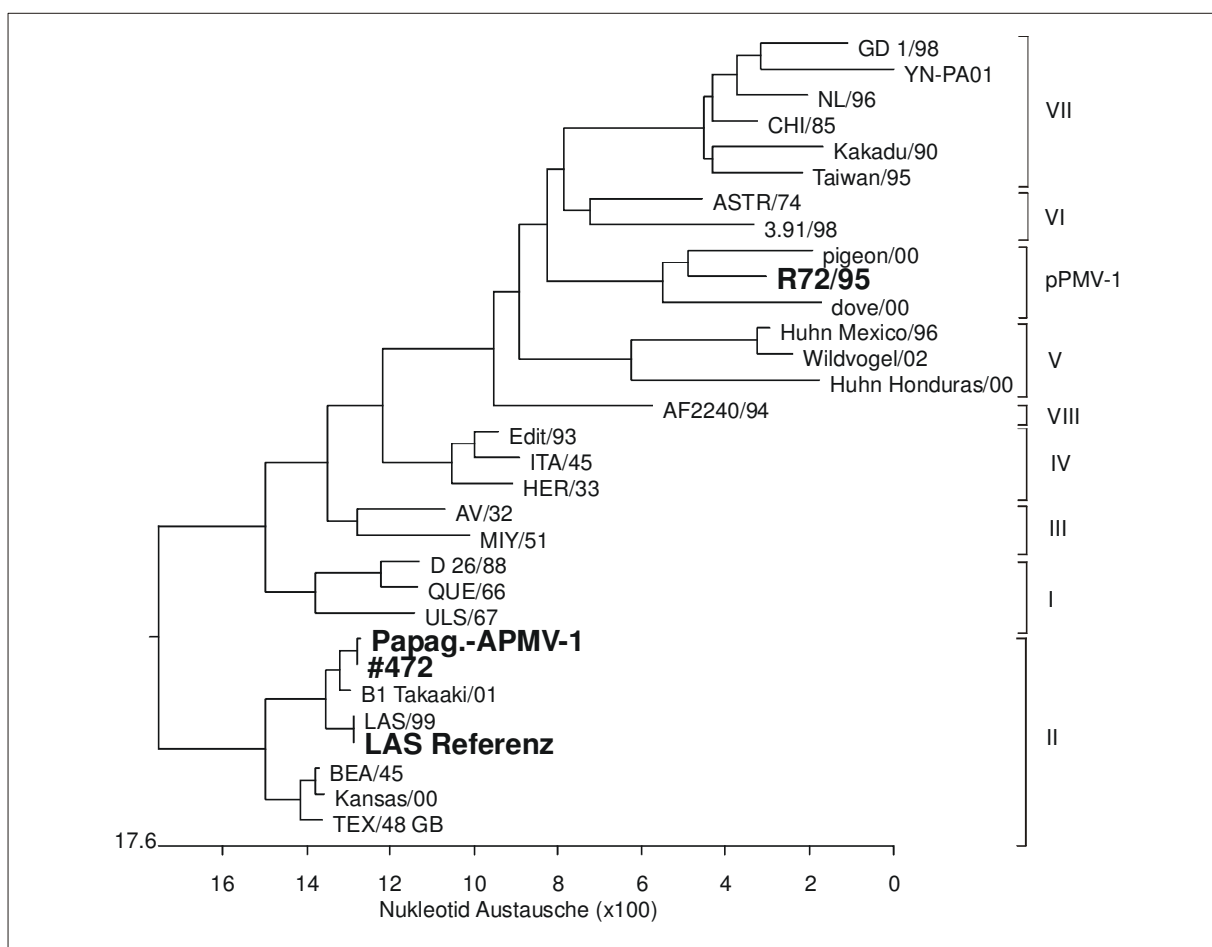
1 NCBI Zugangsnummer siehe Tab. 5

2 Nukleinsäuren 430-1668 der HN-CDS

3 Berechnung von Divergenz und Ähnlichkeit siehe Methodenteil

4 Einordnung beruht auf Abb.6

Bei der Untersuchung des gesamten sequenzierten Bereiches von Position 5977 bis 8655 der genomischen RNA (siehe Abb. 5) bestätigte sich die Identität (0,0 % Divergenz; 0 Nt Abweichung) des Referenzstammes LaSota mit dem bereits publizierten LAS/99. Die sechs Papageien-APMV-1-Isolate zeigten auch über diesen um 1438 Nt längeren Sequenzbereich (insgesamt 2679 Nt) Übereinstimmung. So war bei Isolat #472 wiederum nur der Unterschied an Position 6848 der Gesamt-RNA (A→G) festzustellen. Zusätzliche Abweichungen zu den anderen fünf Papageien-APMV-1 traten nicht auf.

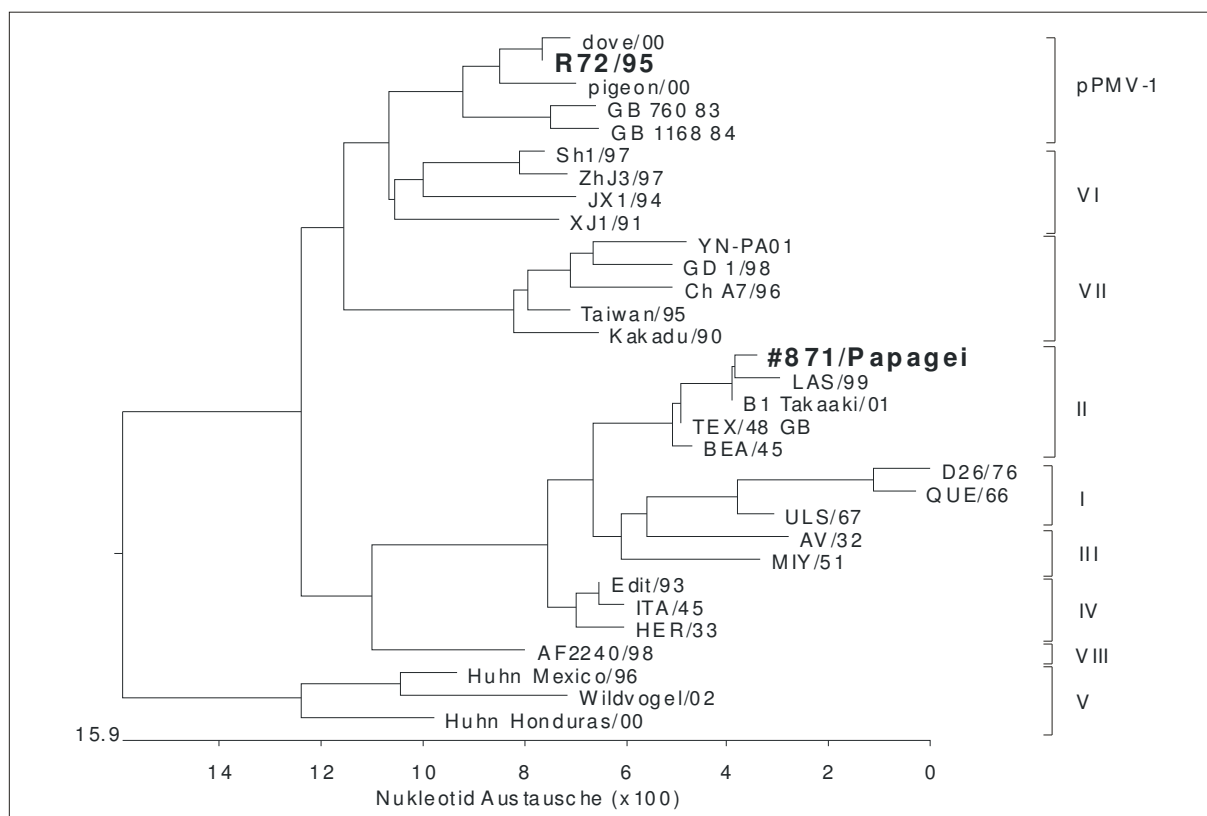


**Abb. 7: Phylogenetisches Dendrogramm verschiedener APMV-1-Genotypen**

Basierend auf einem 1716 Nukleotide langen Fragment der HN-CDS (Position 1 bis 1716) wurden verwandtschaftliche Beziehungen nach der Clustal-W-Methode berechnet. Die genutzten Sequenzen wurden der NCBI Datenbank entnommen und sind im Methodenteil (Tab. 5) aufgeführt.

Die phylogenetische Analyse eines um 477 Nt längeren Fragmentes der CDS des HN-Proteins (Position 1 bis 1716 der HN-CDS) mit repräsentativen Sequenzen (Abb. 7) bestätigte die Gruppierung der Papageien-APMV-1-Isolate zur Gengruppe II mit eindeutiger Zuordnung zu den Impfstämmen LaSota und B1, besonders zu B1. Das pPMV-1 Isolat R72/95 gruppierte mit anderen Isolaten aus Tauben in die pPMV-1-Gengruppe.

Ein phylogenetischer Vergleich der F-CDS auf 213 Nt (Position 1435 bis 1647 der F-CDS) mit zur Verfügung stehenden repräsentativen Sequenzen (Abb. 8) ermöglichte eine eindeutige Zuordnung der Papageien-APMV-1-Isolate zur Gengruppe II und bestätigte die bereits auf dem HN-Gen erhaltenen Ergebnisse. Der stellvertretend für die Isolate aus Tauben untersuchte Stamm R72/95 gruppierte erneut zusammen mit anderen Taubenisolaten in die Gruppe der pPMV-1.



**Abb. 8: Phylogenetisches Dendrogramm verschiedener APMV-1-Genotypen**

Basierend auf einem 213 Nt lange Fragment der F-CDS (Position 1435 bis 1647) wurden verwandtschaftliche Beziehungen nach der Clustal-W-Methode berechnet. Die genutzten Sequenzen wurden der NCBI Datenbank entnommen und sind im Methodenteil (Tab. 5) aufgeführt.

**Tab. 8. Homologie der Papageien-APMV-1 mit repräsentativen APMV-1-Isolaten auf einem Teil des F-Gens**

Isolat <sup>1</sup>	F-Gen <sup>2</sup>		Genotyp <sup>4</sup>
	Divergenz <sup>3</sup> (%)	Ähnlichkeit <sup>3</sup> (%)	
B1 Takaaki/01	0.5	99.5	II
LAS/99	1.4	98.6	II
TEX/48 GB	1.4	98.6	II
BEA/45	1.9	98.1	II
Edit/93	4.9	95.3	IV
ITA/45	5.4	94.8	IV
HER/33	5.4	94.8	IV
MIY/51	6.4	93.9	III
AV/32	7.0	93.4	III
ULS/67	7.0	93.4	I
D26/76	9.6	91.1	I
QUE/66	9.7	91.1	I
AF2240/98	10.7	90.1	VIII
dove/00	12.5	88.7	pPMV-1
<b>R72/95</b>	12.5	88.7	pPMV-1
JX1/94	13.2	88.3	VI
XJ1/91	13.7	87.8	VI
Sh1/97	14.3	87.3	VI
pigeon/00	14.3	87.3	pPMV-1
GB 760 83	14.4	87.3	pPMV-1
Taiwan/95	14.9	86.9	VII
ZhJ3/97	15.0	86.9	VI
GB 1168 84	15.5	86.4	pPMV-1
Kakadu/90	15.5	86.4	VII
GD 1/98	16.7	85.4	VII
YN-PA/01	17.2	85.0	VII
Ch A7/96	18.0	84.5	VII
Huhn Mexico/96	19.3	83.6	V
Huhn Honduras/00	20.0	83.1	V
Wildvogel/02	21.3	82.2	V

1 NCBI Zugangsnummer siehe Tab. 5

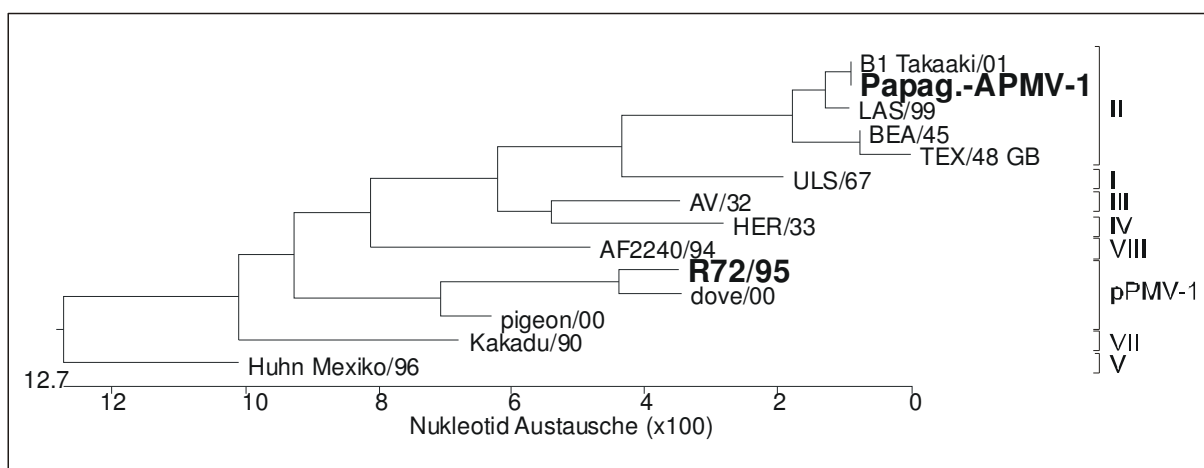
2 Nukleinsäuren 1435-1647 der F-CDS

3 Berechnung von Divergenz und Ähnlichkeit siehe Methodenteil

4 Einordnung beruht auf Abb. 8

Innerhalb der Gengruppe II bestand auf dem F-Gen erneut die größte Homologie (Tab. 8) zum Stamm B1 mit 0,5 % Divergenz gefolgt von La Sota und TEX/48 GB mit 1,4 % Divergenz. Das zum Vergleich untersuchte pPMV-1 Isolat R72/95 war mit

12,5 % Divergenz erneut deutlich unterschiedlich. Das Isolat aus einem Wildvogel aus der Gengruppe V wies mit 21,3 % die höchste Divergenz zu Papageien-APMV-1 auf. Die phylogenetische Analyse eines Teils der L-CDS (275 Nt) mit verfügbaren APMV-1-Sequenzen ergab ebenfalls eine Gruppierung der Papageien-APMV-1 zur Gengruppe II und besonders zum Impfstamm B1 (Abb. 9). Das vergleichend untersuchte pPMV-1 Isolat R72/95 war in diesem Sequenzbereich wiederum mit anderen Isolaten aus Tauben in die Gengruppe pPMV-1 einzuordnen.



**Abb. 9: Phylogenetisches Dendrogramm verschiedener APMV-1-Genotypen**

Basierend auf einem 275 Nukleotide langen Fragment der L-CDS (Position 1 bis 275) wurden verwandtschaftliche Beziehungen nach der Clustal-W-Methode berechnet. Die genutzten Sequenzen wurden der NCBI Datenbank entnommen und sind im Methodenteil (Tab. 5) aufgeführt.

Auf dem L-Gen bestand die größte Homologie wie schon auf dem HN- und F-Gen zum Impfstamm B1 (Tab. 9). Eine 100 %ige Identität zwischen B1 und den Papageien-APMV-1 auf diesem Teil des L-Gens war festzustellen. Innerhalb der Gengruppe II zeigten außerdem LaSota eine Divergenz von 0,7 %, BEA/45 von 1,8 % und TEX/48 GB von 2,6 %. Das APMV-1-Isolat R72/95 vom Taubentyp wies mit 14,8 % Divergenz am deutlichsten von der Sequenz der Papageien-APMV-1 ab.

**Tab. 9. Homologie der Papageien-APMV-1 mit repräsentativen APMV-1-Isolaten auf einem Teil des L-Gens**

Isolat <sup>1</sup>	L-Gen <sup>2</sup>		Genotyp <sup>4</sup>
	Divergenz <sup>3</sup> (%)	Ähnlichkeit <sup>3</sup> (%)	
B1 Takaaki/01	0.0	100.0	II
LAS/99	0.7	99.3	II
BEA/45	1.8	98.2	II
TEX/48 GB	2.6	97.5	II
ULS/67	5.8	94.5	I
AV/32	8.2	92.4	III
HER/33	9.0	91.6	IV
AF2240/94	10.2	90.5	VIII
pigeon/00	12.0	89.1	pPMV-1
Kakadu/90	12.9	88.4	VII
dove/00	14.4	87.3	pPMV-1
Huhn Mexiko/96	14.7	86.9	V
<b>R72/95</b>	14.8	86.9	pPMV-1

1 NCBI Zugangsnummer siehe Tab. 5

2 Nukleinsäuren 1-275 der L-CDS

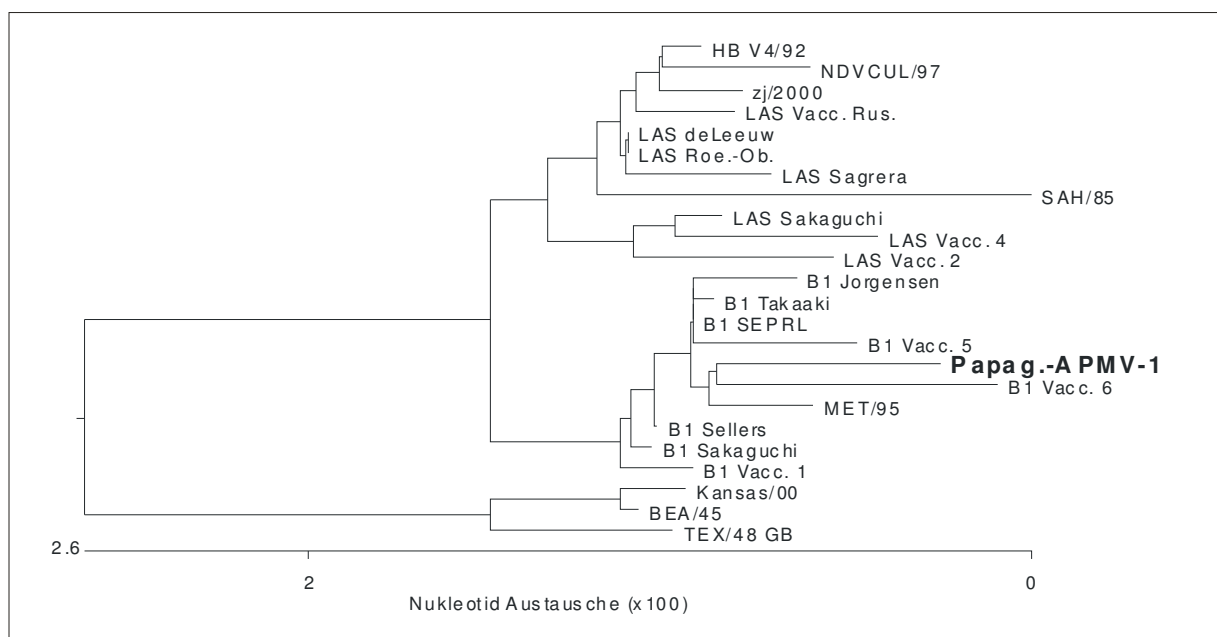
3 Berechnung von Divergenz und Ähnlichkeit siehe Methodenteil

4 Einordnung beruht auf Abb. 9

#### 4.1.2.2. Untersuchungen innerhalb der Gengruppe II

Die phylogenetische Analyse der APMV-1-Isolate aus Papageien und aller verfügbaren HN-CDS (1734 Nt) der Gengruppe II (Abb. 10) lässt eine Unterteilung dieses Genotyps in drei Untergruppen zu: a) Stämme vom LaSota-Typ, b) B1-Stämme und c) Kansas/00, BEA/45 und TEX/48 GB. Die Papageien-APMV-1-Isolate zeigen dabei die engste Verwandtschaft mit der Untergruppe b, den B1-Stämmen. Wie schon auf dem kürzeren Fragment gezeigt (Tab. 7), wichen TEX/48 GB und Kansas/00 am weitesten (3,9 % Divergenz) von den Papageien-APMV-1 ab. Die höchste Divergenz innerhalb der Gengruppe II besteht zwischen SAH/85 und TEX/48 GB (4,6 %).

Der detaillierte Vergleich aller verfügbaren B1-Stämme, Papageien-APMV-1 und LAS/99 mit einer B1-Konsensus-Sequenz über 3912 Nt (Tab. 10) zeigte, dass auf dem HN-Gen einschließlich nichtkodierender Bereiche LAS/99 die meisten Abweichungen vom B1-Konsensus aufweist, gefolgt von den Papageien-APMV-1-Isolaten und von B1



**Abb. 10: Phylogenetisches Dendrogramm der APMV-1-Gengruppe II**

Basierend auf der HN-CDS (1734 Nt) wurden verwandtschaftliche Beziehungen nach der Clustal-W-Methode berechnet. Die genutzten Sequenzen wurden der NCBI Datenbank entnommen und sind im Methodenteil (Tab. 5) aufgeführt.

(Jorgensen). Auch innerhalb der HN-CDS waren bei LAS/99 (17) die meisten Veränderungen festzustellen. Der Stamm Vacc. 6 (15) zeigte hier drei Abweichungen mehr als die Papageien-APMV-1-Isolate (12). Bemerkenswert ist, dass bei den Papageien-APMV-1-Isolaten zehn dieser zwölf Unterschiede an Positionen auftraten (Tab. 11), die bei den anderen B1-Stämmen und LAS/99 einheitlich sind. Bei LAS/99 war dies nur bei sieben von 17 Abweichungen der Fall. Eine Abweichung an der Position 7172 (C→T) trat außer bei den Papageien-APMV-1 noch bei MET95, LAS/99 und Vacc. 6 auf. Der zwölfte Unterschied an Stelle 7975 war sowohl bei den Papageien-APMV-1 (A→G) als auch bei Vacc. 6 (A→T) zu beobachten.

Auf dem F-Gen (ab Position 247) waren zwölf Abweichungen der Papageien-APMV-1 zur B1-Konsensus-Sequenz zu beobachten. LAS/99 wich in diesem Bereich an 13 Stellen (zwölf innerhalb der F-CDS) vom B1-Konsensus ab. Die meisten Abweichungen unter den B1-Impfstämmen, nämlich vier, zeigte die von Toyoda et al. (1989) veröffentlichte Sequenz eines B1-Stammes.

Auf dem untersuchten Teil des L-Gens (Positionen 1 – 286) waren bei LAS/99 zwei Abweichungen zur B1-Konsensus-Sequenz festzustellen (Tab. 10), die beide innerhalb der CDS liegen.

Im intergenischen Bereich zwischen F- und HN-Gen war bei keinem der untersuchten Isolate eine Abweichung von der B1-Konsensus-Sequenz festzustellen. Der intergenische Bereich zwischen HN- und L-Gen zeigte je eine Veränderung (Tab. 10) zum B1-Konsensus bei den Papageienisolaten und bei B1 (Takaaki).

**Tab. 10: Anzahl der Nukleinsäureabweichungen verschiedener B1-Stämme zu einer B1-Konsensussequenz**

Sequenz <sup>1</sup>	F-Gen <sup>2,3</sup>	F-CDS <sup>2,3</sup>	AS <sup>2,3</sup>	intergenisch	HN-Gen	HN-CDS	AS	intergenisch	L-Gen <sup>4</sup>	L-CDS <sup>4</sup>	AS <sup>4</sup>
B1 SEPR	/	/	/	/	/	0	0	/	/	/	/
B1 (Takaaki)	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
B1 (Sellers)	1	1	0	0	2	2	2	0	0	0	0
B1 (Toyoda/Sakaguchi)	4	4	0	0	4	4	2	/	/	/	/
B1 (Jorgensen)	/	/	/	0	7	5	1	/	/	/	/
MET95	/	/	/	/	/	6	4	/	/	/	/
B1 Vacc. 1	/	/	/	/	/	7	3	/	/	/	/
B1 Vacc. 5	/	/	/	/	/	8	6	/	/	/	/
B1 Vacc. 6	/	/	/	/	/	15	12	/	/	/	/
Papageien APMV-1	12	12	4	0	14	12	8	1	0	0	0
LAS/99	13	12	2	0	22	17	5	0	2	2	0

Die Zahlen stehen für Nukleotidabweichungen gegenüber einer B1-Konsensus-Sequenz

CDS: Zahl der Abweichungen davon auf der kodierenden Sequenz

AS: Zahl der Abweichungen, die auch zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen

1 NCBI Zugangs-Nr. siehe Tabelle 5

2 die Anzahl der Abweichungen wurde ab Nukleotid 247 des F-Gens (201 der CDS) ermittelt

3 Nukleotid 247 - 1479 des F-Gens (201 - 1433 der CDS) aus: Grund und Goltz, 2000

4 die Anzahl der Abweichungen wurde von Nukleotid 1 - 286 des L-Gens (1 - 275 der CDS) ermittelt

/ Sequenz-Daten nicht verfügbar





### 4.1.2.3. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Der Vergleich der sequenzierten APMV-1-Isolate und eines weiteren Isolates aus der pPMV-1-Gengruppe (pigeon/00) sowie eines Vertreters jeder Gengruppe mit einer Konsensus-Sequenz aus verfügbaren B1-Stämmen (Tab. 12) auf der Ebene der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des HN-Proteins zeigt Unterschiede zwischen diesen antigenetisch verschiedenen APMV-1-Isolaten. So wies im untersuchten Bereich des HN-Proteins (As 1 bis 556) Papageien-APMV-1 acht und der Impfstamm LAS/99 fünf Abweichungen zur B1-Konsensus-Sequenz auf, obwohl LAS/99 auf der HN-CDS mehr Austausche auf der Nukleinsäureebene gezeigt hatte (Tab. 10). Sechs (Papageien-APMV-1) bzw. zwei (LAS/99) der Aminosäureveränderungen traten bei keinem anderen Isolat auf. Demgegenüber waren bei den antigenetisch unterschiedlichen Isolaten aus Tauben deutlich mehr Abweichungen festzustellen. Die pPMV-1 Isolate R72/95 und pigeon/00 wichen an 67 (R72/95) bzw. 65 (pigeon/00) Positionen vom B1-Konsensus ab. Davon waren sieben (R72/95) bzw. sechs (pigeon/00) Unterschiede bei keinem anderen in die Untersuchung einbezogenen Isolat nachweisbar.

Auch die zwei weiteren Isolate aus Tauben (#7780 und #8226) wurden im sequenzierten Bereich (As 144 bis 556 des HN-Proteins) untersucht (Tab. 12) und wiesen mit 39 (#7780) und 34 (#8226) Abweichungen (R72/95: 38, pigeon/00: 39) deutlich mehr Veränderungen als Papageien-APMV-1 und LaSota (beide fünf) auf. Das APMV-1-Isolat #8226, welches in eine von den restlichen APMV-1-Isolaten aus Tauben separate Gengruppe einzuordnen war, zeigte unter den Isolaten aus Tauben die wenigsten Unterschiede (34) zu einer B1-Konsensus-Sequenz. Vertreter anderer Gengruppen wiesen wie die Isolate aus Tauben eine deutlich höhere Zahl von Abweichungen zum B1-Konsensus auf als Papageien-APMV-1 und LAS/99.

Tab. 12: Aminosäureunterschiede der untersuchten APMV-1 Isolate aus Papageien und Tauben sowie eines Isolates exemplarisch für jede APMV-1 Gengruppe im Vergleich zu einer B1-Konsensussequenz

Isolat <sup>1</sup>	Gen- gruppe <sup>2</sup>	HN-Protein <sup>3</sup>																													
		3	7	13	19	24	28	29	31	32	33	41	43	45	48	54	57	60	61	62	63	65	66	68	69	71	73	75	87	101	102
B1-Konsensus	II	R	Q	D	N	I	A	I	F	L	T	V	S	L	M	S	V	P	T	R	I	R	A	E	K	T	T	G	Q	T	T
LAS/99	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Papag.-APMV-1	II	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-
R72/95	pPMV-1	H	K	E	-	V	S	V	L	-	I	A	V	V	T	R	-	S	-	V	V	K	V	D	-	M	L	S	-	S	I
pigeon/00	pPMV-1	Y	K	E	S	V	-	V	L	-	I	-	A	V	-	R	-	S	I	T	V	K	-	D	R	-	L	S	-	S	I
#7780	pPMV-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
#8226	?	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
ULS/67	I	-	-	-	-	V	-	-	L	-	-	A	A	A	-	-	I	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	S	-
MIY/51	III	-	-	-	-	V	-	T	L	-	I	A	A	A	-	G	-	-	A	-	A	-	-	-	-	-	A	-	-	S	I
HER/33	IV	-	R	E	-	V	-	-	L	-	I	A	A	V	-	G	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-	A	S	-	S	V
Huhn Mexiko/96	V	-	R	E	-	V	-	V	S	-	I	-	A	V	-	N	A	S	-	V	-	-	-	D	R	-	L	N	-	S	I
3.91/98	VI	-	R	E	-	V	-	V	L	-	I	A	A	V	-	R	A	S	-	V	-	K	T	D	-	K	L	S	-	S	I
CHI/85	VII	-	R	E	-	V	-	V	L	-	M	A	A	V	-	R	A	S	-	V	-	K	T	D	-	-	L	S	-	S	I
AF2240/94	VIII	-	R	E	-	V	-	V	L	-	I	A	A	V	-	-	-	S	-	A	-	-	-	D	-	-	L	S	-	S	I

Tab. 12. Fortsetzung

Isolat <sup>1</sup>	Gen- gruppe <sup>2</sup>	HN-Protein <sup>3</sup>																														
		107	112	122	123	127	145	146	147	156	197	199	203	249	254	257	263	265	266	269	276	288	290	293	304	309	310	315	320	324	329	
B1-Konsensus	II	I	Y	G	W	I	A	S	D	F	R	H	H	M	A	A	T	N	A	V	R	G	V	T	G	G	D	S	S	L	T	V
LAS/99	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-
Papag.-APMV-1	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R72/95	pPMV-1	V	H	R	C	V	I	-	G	Y	-	-	-	I	V	A	K	V	T	S	-	I	V	K	S	-	D	P	-	S	A	
pigeon/00	pPMV-1	-	H	R	C	V	I	-	G	Y	I	-	-	I	V	A	K	V	T	S	S	S	T	V	K	S	N	D	P	W	S	A
#7780	pPMV-1	/	/	/	/	/	/	/	G	Y	I	-	-	I	V	A	K	V	T	S	-	T	V	K	S	N	D	P	-	S	A	
#8226	?	/	/	/	/	/	/	/	-	Y	-	-	-	I	V	-	K	I	T	S	-	I	V	K	S	-	D	P	-	S	A	
ULS/67	I	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	S	-	-	-	E	-	-	N	P	-	S	A	
MIY/51	III	-	-	-	C	V	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	T	S	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	S	A	
HER/33	IV	-	-	-	C	V	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	S	V	S	S	-	-	-	-	K	-	-	N	P	-	S	-
Huhn Mexiko/96	V	-	-	-	C	V	T	-	-	Y	-	-	-	-	V	-	K	V	T	S	-	-	V	K	-	-	D	P	-	S	A	
3.91/98	VI	-	-	-	C	V	T	-	-	Y	-	-	-	-	V	-	K	V	A	L	-	-	I	V	K	-	G	D	P	-	S	A
CHI/85	VII	-	-	-	C	V	I	-	-	Y	-	-	-	-	V	-	K	V	T	S	-	-	T	V	K	-	-	D	P	-	S	A
AF2240/94	VIII	-	-	-	C	V	T	-	-	Y	-	-	-	-	V	-	K	V	T	S	-	-	T	V	K	-	N	D	P	-	S	A

Tab. 12: Fortsetzung

Isolat <sup>1</sup>	Gen- gruppe <sup>2</sup>	HN-Protein <sup>3</sup>																												AW <sup>4</sup>		
		333	342	347	349	357	369	395	396	404	432	440	452	453	464	466	477	479	494	495	497	502	508	509	514	522	540	a <sup>5</sup>	b <sup>6</sup>	g <sup>7</sup>		
B1-Konsensus	II	K	D	E	D	S	I	V	T	I	S	S	I	S	V	I	Y	G	E	A	A	S	T	I	I	I	T	0	0	0		
LAS/99	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	T	0	5	5			
Papag.-APMV-1	II	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	3	5	8				
R72/95	pPMV-1	-	N	G	E	-	V	I	-	V	Y	-	I	V	P	I	V	-	D	-	E	V	N	I	V	T	V	29	38	67		
pigeon/00	pPMV-1	-	N	G	-	-	V	-	-	V	Y	N	-	V	P	I	V	-	D	-	-	V	N	I	V	T	V	26	39	65		
#7780	pPMV-1	-	N	G	E	-	V	I	-	V	Y	N	-	V	P	I	V	-	D	-	-	V	N	I	V	T	V	/	39	/		
#8226	?	N	N	-	S	A	V	I	-	-	H	-	I	V	-	I	-	H	D	I	-	V	N	I	V	T	/	34	/			
ULS/67	I	-	-	-	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	V	-	V	-	D	-	-	V	-	I	-	T	13	21	34			
MIY/51	III	R	-	-	-	-	V	-	-	V	N	-	V	-	V	-	V	H	D	-	-	V	N	V	-	T	19	25	44			
HER/33	IV	R	-	-	-	-	V	-	-	V	N	-	V	-	V	-	-	H	D	G	-	V	N	I	-	T	19	27	46			
Huhn Mexiko/96	V	-	N	-	-	-	V	-	-	R	-	-	V	-	I	V	H	N	-	-	V	Y	-	-	T	V	28	32	60			
3.91/98	VI	-	N	G	-	-	V	I	-	V	-	-	-	-	-	-	V	H	D	K	E	V	N	I	V	T	A	31	33	64		
CHI/85	VII	-	N	-	-	-	V	I	-	V	N	-	V	-	I	-	H	D	-	-	V	N	I	V	T	A	29	31	60			
AF2240/94	VIII	R	N	-	-	-	V	-	-	V	N	-	V	-	I	V	H	D	-	-	I	N	I	-	T	A	23	35	58			

1 NCBI Zugangs-Nr. siehe Tab. 5

2 Einordnung nach Abb. 7

3 Aminosäureposition auf dem HN-Protein

4 AW: Zahl der Abweichungen von der B1-Konsensus-Sequenz

5 a: Zahl der Abweichungen im Bereich der Aminosäuren 1 - 143 des HN-Proteins

6 b: Zahl der Abweichungen im Bereich der Aminosäuren 144 - 556 des HN-Proteins

7 g: Gesamtzahl der Abweichungen im Bereich der Aminosäuren 1 - 556 des HN-Proteins

Abweichung tritt nur bei diesem Isolat auf

Betrachtet man die Aminosäureabweichungen der Papageien-APMV-1 von einer B1-Konsensus-Sequenz innerhalb der Gruppe der B1-Stämme auf dem HN-Protein (Tab. 13), so werden erneut Unterschiede zu diesen am nächsten verwandten Stämmen deutlich. Papageien-APMV-1 wies mehr Unterschiede zum B1-Konsensus auf als die untersuchten B1-Stämme. Eine Ausnahme bildete dabei die abgeleitete Aminosäuresequenz von Vacc. 6, die mit zwölf Aminosäureaustauschen am meisten von Veränderungen betroffen war. Eine Veränderung der Papageien-APMV-1 zum B1-Konsensus war im transmembranen Bereich des HN-Proteins lokalisiert, zwei im Stiel der Ektodomäne und fünf im globulären Kopf des Proteins (Tab. 13). Bei dem Papageien-APMV-1-Isolat #472 trat der Austausch 146S→N nicht auf. Es wies, wie alle untersuchten APMV-1-Sequenzen an dieser Stelle ein Serin auf.

Von den acht Abweichungen der Papageien-APMV-1 auf dem HN-Protein waren sechs unter den untersuchten B1-Stämmen konserviert (Tab. 13). Ein Sequenz-Vergleich mit exemplarisch für jede Gengruppe ausgewählten APMV-1-Stämmen (Tab. 12) zeigt, dass mit Ausnahme von 57V diese Positionen auch unter APMV-1-Isolaten anderer Gengruppen konserviert sind. Position 522 war zwar zumindest unter den Stämmen der Gengruppe II variabel, ein Valin trat jedoch bei keiner der zum Vergleich betrachteten APMV-1-Sequenzen auf.

Auf der F-CDS (ab Nt-Position 247) führten bei den Papageien-APMV-1 von elf Nukleotid-Abweichungen vier zu einer Veränderung der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Demgegenüber wich der Referenzstamm LAS/99 in diesem Bereich an zwölf Nukleotiden vom B1-Konsensus ab, die aber nur in zwei Fällen zu einer Veränderung der abgeleiteten Aminosäuresequenz führten. Bei keinem der untersuchten B1 Isolate führten die festgestellten Nukleinsäureabweichungen auch zu einer Veränderung der abgeleiteten Aminosäuresequenz.

Die Abweichung 525L→I auf dem F-Protein bei Papageien-APMV-1 ist im carboxyterminalen Ende des F1-Proteins innerhalb der transmembranen Domäne lokalisiert. Die restlichen drei Austausche im Vergleich zu einer B1-Konsensus-Sequenz befinden sich in dem aus der Virushülle hervorstehenden F<sub>1</sub>-Fragment (Grund et al., 2002).

Auf dem L-Protein kam es nicht zu Veränderung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Vergleich zur B1-Konsensus-Sequenz.

Tab. 13: Aminosäureunterschiede verschiedener B1-Stämme im Vergleich zu einer B1-Konsensussequenz

Sequenz <sup>1</sup>	F-Protein <sup>2,3</sup>						AW <sup>4</sup>	HN-Protein <sup>2</sup>													
	226	231	251	312	333	525		32	50	57	87	146	155	158	164	169	185	188	199	200	203
B1-Konsensus	T	N	I	R	L	L	L	L	A	V	Q	S	A	E	P	G	Y	T	H	S	H
B1 SEPRL	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1 Takaaki	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1 (Jorgensen)	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-
B1 (Sellers)	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
B1 (Toy./Sak.)	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
MET95	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1 Vacc. 1	/	/	/	/	/	/	/	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
B1 Vacc. 5	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-
B1 Vacc. 6	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Papag.-APMV-1	I	S	-	-	F	I	4	S	-	A	H	N	E	D	W	R	D	S	-	R	-
LAS/99	-	-	V	K	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
Protein-Teil <sup>6</sup>	F <sub>1</sub>						TM	Stiel						globulärer Kopf							

Tab. 13. Fortsetzung

Sequenz <sup>1</sup>	HN-Protein <sup>2</sup>															AW <sup>4</sup>	eAW <sup>5</sup>		
	207	211	216	254	266	324	362	385	396	433	495	511	519	520	521			522	541
B1-Konsensus	A	L	T	A	V	T	G	D	T	N	E	R	S	S	S	I	Y	L	
B1 SEPR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
B1 Takaaki	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	1
B1 (Jorgensen)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
B1 (Sellers)	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
B1 (Toy./Sak.)	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
MET95	-	-	I	V	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	4
B1 Vacc. 1	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
B1 Vacc. 5	P	-	-	-	-	-	R	E	-	-	-	-	-	-	R	-	H	-	6
B1 Vacc. 6	-	R	-	V	-	-	-	-	-	-	-	C	P	T	-	S	-	-	12
Papag.-APMV-1	-	-	-	V	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	V	-	-	8
LAS/99	-	-	-	V	-	S	-	-	-	-	V	-	-	-	-	T	-	-	5
Protein-Teil <sup>6</sup>	globulärer Kopf																		

1 NCBI-Zugangsnummer für benutzte Sequenzen siehe Tab. 5

2 Aminosäureposition bezogen auf das jeweilige Protein

3 ab Aminosäure 68 des F-Proteins; Aminosäuren 68 - 478 aus: Grund und Goltz, 2000

4 AW: Zahl der Abweichung von der B1-Konsensus-Sequenz

5 eAW: davon Zahl der einzigartigen Abweichungen von der B1-Konsensus-Sequenz

6 Lage auf dem jeweiligen Protein: TM: transmembraner Anteil des HN-Proteins

- Aminosäure identisch zur B1-Konsensus-Sequenz

/ Sequenz-Daten nicht verfügbar

Abweichung tritt nur bei diesem Isolat auf



## **4.2. Entwicklung einer Nachweismethode für virale RNA des APMV-1 aus dem Kot von Papageien**

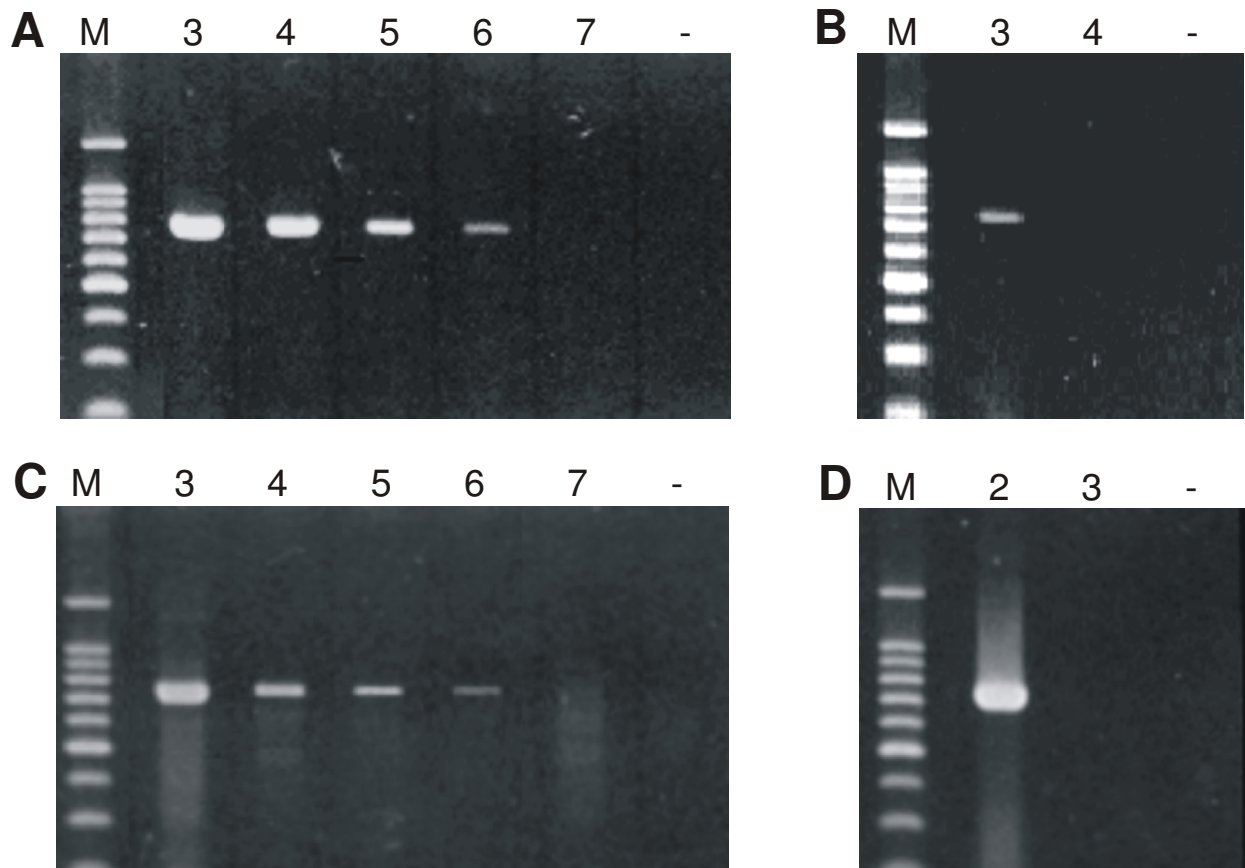
Um die bei subklinischen APMV-1-Infektionen ausgeschiedenen Erreger charakterisieren zu können, wurde eine Methode zum Nachweis von APMV-1-RNA aus dem Kot von Papageien entwickelt. Eine RT-PCR mit mehreren überlappenden Primerpaaren wurde bereits für die Amplifikation viraler RNA aus virushaltiger Amnio-Allantois-Flüssigkeit (AAF) zur Sequenzierung der Produkte benutzt. Diese RT-PCR sollte nun zum Nachweis aus Kot mit dem Primerpaar HN1A (siehe Abb. 5) verwendet werden, da mit den Primern ein Teil der HN-CDS (740 von 1734 Nt) abgedeckt wird.

### **4.2.1. Optimierung der Extraktion von viraler RNA des APMV-1 aus dem Kot von Papageien**

Initiale Versuche verglichen anhand der Nachweisgrenze einer APMV-1 spezifischen RT-PCR zwei Methoden der RNA-Extraktion. Dazu wurde APMV-1-haltige AAF (Titer:  $1,37 \times 10^9$  EID<sub>50</sub>/ml) in verschiedenen Verdünnungen mit Kot von Papageien und zum Vergleich mit PBS versetzt. Nach Vermischung der virushaltigen AAF mit PBS war es möglich mit dem QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Kit und anschließender RT-PCR virale RNA bis zu einer Endverdünnung von  $10^{-6}$  nachzuweisen (Abb. 11 A). Dies entspricht einer Nachweisgrenze von  $1,37 \times 10^3$  EID<sub>50</sub>/ml. Diese Nachweisgrenze wurde auch nach RNA-Isolierung mit dem peqGOLD RNA Pure<sup>™</sup> FL Kit ermittelt (Abb. 11 C). Demgegenüber war mit dem QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Kit nach Vermischung der APMV-1-haltigen AAF mit Kot nur bis zu einer Endverdünnung von  $10^{-3}$  ( $1,37 \times 10^6$  EID<sub>50</sub>/ml; Abb. 11 B) ein positives Signal mit der RT-PCR zu erzielen. Nach RNA-Extraktion aus Kot mit dem peqGOLD RNA Pure<sup>™</sup> FL Kit lag die Nachweisgrenze der APMV-1-RT-PCR für virale RNA bei  $10^{-2}$  ( $1,37 \times 10^7$  EID<sub>50</sub>/ml; Abb. 11 D).

Damit war die Sensitivität der APMV-1-RT-PCR aus virushaltiger AAF nach Vermischung mit Kot von Papageien um das 1.000- bzw. 10.000-fache niedriger als nach Vermischung mit PBS. Bei einer Vermischung von virushaltiger AAF mit Kot war

die RT-PCR nach RNA-Extraktion mit dem QIAamp® Viral RNA Kit zehnmal sensitiver als mit dem peqGOLD RNA Pure™ FL Kit. Deswegen wurde für die folgenden Untersuchungen von Kotproben der QIAamp® Viral RNA Kit verwendet.

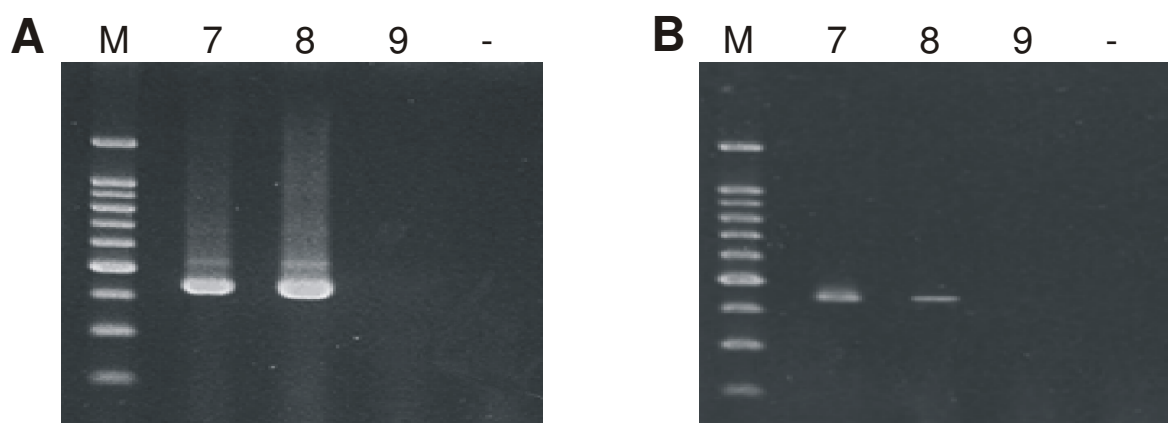


**Abb. 11: Detektion von viraler RNA des APMV-1 mittels RT-PCR nach RNA-Extraktion mit dem QIAamp® Viral RNA Kit und mit peqGOLD RNA Pure™ FL.** Vorverdünnte ( $\log_{10}$ ) APMV-1-haltige AAF wurde mit PBS bzw. mit Kot von Papageien vermischt. Gezeigt werden die Agarose Gele nach Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung mit den Produkten der RT-PCR nach RNA-Isolierung aus PBS (**A, C**) und Kot (**B, D**). Dabei wurde bei (**A**) und (**B**) der QIAamp® Viral RNA Kit und bei (**C**) und (**D**) peqGOLD RNA Pure™ FL verwendet. M: Molekulargewichtsmarker; Zahl x: Endverdünnung  $10^{-x}$ ; -: Wasserkontrolle.

#### 4.2.2. Entwicklung einer RT-nested PCR zum Nachweis von viraler RNA des APMV-1 aus Kot von Papageien

Um die Sensitivität der bisher verwendeten RT-PCR zu steigern, wurde eine RT-nested PCR entwickelt. Zusätzlich zu dem bereits verwendeten Primerpaar HN1A (Abb. 5) bindet dabei ein inneres Primerpaar. Das Amplifikationsprodukt reicht von Position 484 bis 923 (440 von 1734 Nt) der HN-CDS und beinhaltet damit zwei von fünf Abweichungen der Papageien-APMV-1-Isolate von einem B1-Konsensus innerhalb des globulären Kopfes der abgeleiteten Aminosäuresequenz des HN-Proteins. Zur Überprüfung des Bindungsspektrums der ausgewählten Primer wurde die RT-nested PCR mit den Isolaten Ulster (Gengruppe I), LaSota (Gengruppe II), Papageien-PMV-1 (Gengruppe II) und R72/95 (pPMV-1) durchgeführt und ergab in allen Fällen Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe (440 Nt). Eine direkte Sequenzierung der Produkte bestätigte Papageien-APMV-1, LaSota und R72/95 als identisch mit den in 4.1.2. ermittelten Sequenzen und auch die Sequenz von Ulster wich nur an einer von 395 Nt von der veröffentlichten (Sakaguchi et al., 1989) Sequenz des Isolates Ulster 67 ab.

Bei weiteren Versuchen konnte mit Hilfe der RT-nested PCR eine deutliche Steigerung



**Abb. 12: Sensitivität der RT-nested PCR.**

Agarose Gele nach Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung mit den Produkten der RT-nested PCR nach RNA-Isolierung aus, mit verdünnter ( $\log_{10}$ ) APMV-1-haltiger AAF vermischten, PBS- (A) und Kotproben (B). M: Molekulargewichtsmarker; Zahl x: Endverdünnung  $10^x$ ; -: Wasserkontrolle.

der Sensitivität demonstriert werden. Nach PBS-Verdünnung von APMV-1-haltiger AAF wurde mit der entwickelten RT-nested PCR virale RNA bis zu einer Endverdünnung von  $10^{-8}$  nachgewiesen (Abb. 12 A). Damit lag die Nachweisgrenze bei 13,7 EID<sub>50</sub>/ml, was einer 100-fachen Steigerung der Sensitivität im Vergleich zur „klassischen“ RT-PCR entspricht (Abb. 11 A). Auch aus Kot lag die Nachweisgrenze bei einer Endverdünnung von  $10^{-8}$  bzw. 13,7 EID<sub>50</sub>/ml (Abb. 12 B). Damit konnte mit Hilfe der RT-nested PCR eine  $10^5$  fache Steigerung der Sensitivität des Nachweises viraler RNA aus Kot erreicht werden (vgl. Abb. 11 B).

### **4.3. Untersuchung von Kotproben aus Papageien**

#### **4.3.1. Virusisolierung und RT-nested PCR**

Mit Hilfe der oben beschriebenen RT-nested PCR wurden nun Kotproben von Papageien untersucht, bei denen in der elektronenmikroskopischen Untersuchung paramyxovirusartige Partikel beobachtet wurden (Tab. 14). Ein Nachweis viraler RNA mit Hilfe der RT-nested PCR gelang nicht. Dies galt auch für die Kotprobe des Graupapageien 2 (GP2), welcher experimentell mit dem in der RT-nested PCR sicher nachweisbaren Isolat #599 infiziert worden war. Die Tiere GP4 und GP5 sind ein natürlich (GP4) mit APMV-1-infizierter Graupapagei sowie ein Sentineltier (GP5; Grund 2004). Der natürlich infizierte Gelbbrustara (GA) wurde als Patient in der Klinik für Vögel stationär gehalten. Bei den restlichen Papageien handelt es sich um Angehörige verschiedener Spezies, die teilweise klinisch gesund und teilweise aufgrund von Erkrankungen Patienten unserer Klinik waren. Bis auf GP5 waren bei allen 15 untersuchten Kotproben im Elektronenmikroskop paramyxovirusartige Partikel zu erkennen.

Auch der Versuch einer Virusisolierung über die Anzucht auf bebrüteten SPF Hühnereiern schlug bei allen Proben fehl (Tab. 14).

Tab. 14. Untersuchung von Kotproben verschiedener Papageien

Nr. (Name)	Tierart	Species	EM (Nk.)	Virus- Isolierung	RT nested PCR	Klinikbefunde
1 (GP2)	Graupapagei	<i>(Psittacus erithacus)</i>	+	Ø	Ø	NPMD Verdacht
2 (GP4)	Graupapagei	<i>(Psittacus erithacus)</i>	+	Ø	Ø	o.b.B.
3 (GP5)	Graupapagei	<i>(Psittacus erithacus)</i>	Ø	Ø	Ø	o.b.B.
4	Graupapagei	<i>(Psittacus erithacus)</i>	+	Ø	Ø	NPMD Verdacht
5	Graupapagei	<i>(Psittacus erithacus)</i>	+	Ø	Ø	Befiederungsstörungen
6	Graupapagei	<i>(Psittacus erithacus)</i>	+	Ø	Ø	Bissverletzung, Rachitis
7	Taubenhalsamazone	<i>(Amazona vinacea)</i>	+	Ø	Ø	NPMD Verdacht
8	Gelbnackenamazone	<i>(Amazona ochrocephala auropalliata)</i>	+	Ø	Ø	NPMD Verdacht
9	Venezuelaamazone	<i>(Amazona amazonica)</i>	+	Ø	Ø	o.b.B.
10	Blaustirnamazone	<i>(Amazona aestiva)</i>	+	Ø	Ø	NPMD Verdacht
11	Dunkelroter Ara	<i>(Ara chloroptera)</i>	+	Ø	Ø	EZ reduziert, sonst o.b.B.
12 (GA)	Gelbbrustara	<i>(Ara ararauna)</i>	+	Ø	Ø	Schwermetallintoxikation
13	hellroter Ara	<i>(Ara macao)</i>	+	Ø	Ø	Befiederungsstörungen
14	Goffinikakadu	<i>(Cacatua goffini)</i>	+	Ø	Ø	o.b.B.
15	Salomonen-Edelpapagei	<i>(Eclectus roratus)</i>	+	Ø	Ø	NPMD Verdacht

EM (Nk.) elektronenmikroskopische Untersuchung im Negativkontrast

+ positiv/erfolgreich

Ø negativ/nicht erfolgreich

o.b.B. ohne besonderen Befund

EZ Ernährungszustand

### 4.3.2. Viruspräparationen aus aufgereinigten Kotproben: Untersuchung im Elektronenmikroskop mittels Ultradünnschnitt-Technik und mit der RT-nested PCR

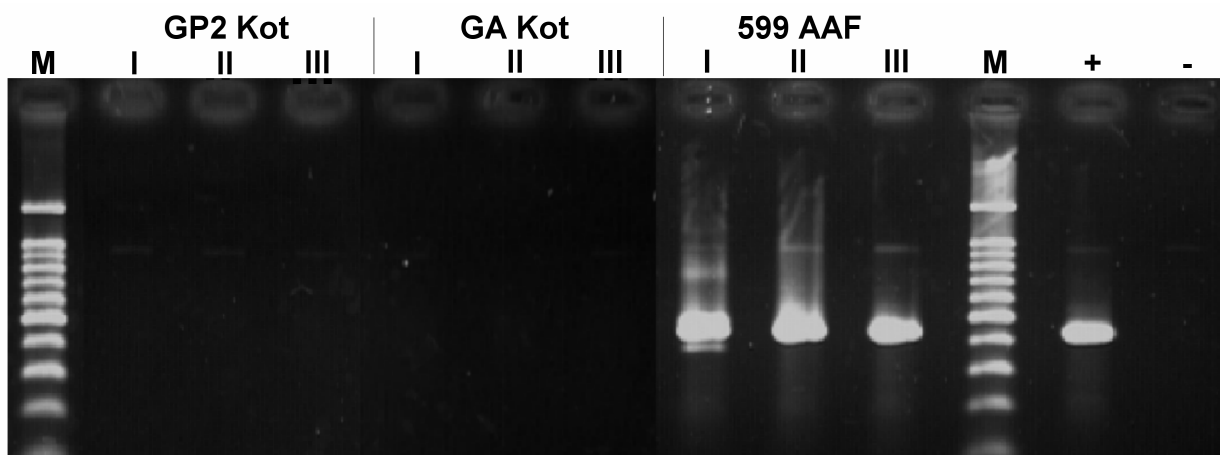
Um eine Beeinflussung durch im Kot enthaltene Inhibitoren der RT-nested PCR zu minimieren bzw. um mit Hilfe der Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie Aussagen über die inneren Strukturen der mit dem Kot ausgeschiedenen Partikel treffen zu können, wurde eine Aufreinigung von PMV aus Kotproben durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten durchgeführt. Ausgangsmaterial für diese Untersuchung war der elektronenmikroskopisch Paramyxovirus-positive Kot von GP2 und GA (Tab. 14, Nr. 1 und 12), von dem eine ausreichende Menge verfügbar war. Als Referenz diente Papageien-APMV-1-haltige AAF (#599). Im Saccharose-Gradienten waren sowohl bei den Kotpräparationen der Papageien als auch bei der Referenz (#599-AAF) drei Banden sichtbar, die fraktioniert abgenommen wurden. Bande I war bei den Präparationen aus Kot nur undeutlich zu sehen und wurde deshalb ausschließlich mittels RT-nested PCR untersucht. Die refraktometrische Messung ergab für die Fraktion I aus #599-AAF eine Dichte von  $1,100 \text{ g/cm}^3$  (Tab. 15). Die Fraktionen II und III der Präparationen aus Kot wiesen nahezu übereinstimmende Dichten auf. Die #599-haltige AAF wich davon jeweils geringfügig ab (Tab.15). So lag die Dichte der Fraktion II aus Kotpräparationen bei  $1,127$  (GP/2) bzw.  $1,129 \text{ g/cm}^3$  (GA) und die aus AAF (#599) bei  $1,139 \text{ g/cm}^3$ . Die Dichte der Fraktion III für die Präparationen aus Kot wurde mit  $1,208$  (GP2) bzw.  $1,207 \text{ g/cm}^3$  (GA) bestimmt, diejenige aus AAF (#599) mit  $1,193 \text{ g/cm}^3$ .

**Tab.15: Dichte der Fraktionen nach Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten**

Proben-Herkunft / Material	Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III
	Dichte [ $\text{g/cm}^3$ ] / (% Saccharose)		
#599 / AAF	1,100 / (24)	1,139 / (32)	1,193 / (43)
GP2 / Kot	/	1,127 / (30)	1,208 / (46)
GA / Kot	/	1,129 / (31)	1,207 / (46)

Die RT-nested PCR mit den abgenommenen Fraktionen aus den Viruspräparationen wies in allen drei Fraktionen der virushaltigen AAF (#599) virale RNA des APMV-1 nach (Abb. 13). In keiner Fraktion der beiden Viruspräparationen aus Kot war jedoch

nach RT-nested PCR und Elektrophorese ein Amplifikationsprodukt im Agarosegel sichtbar.



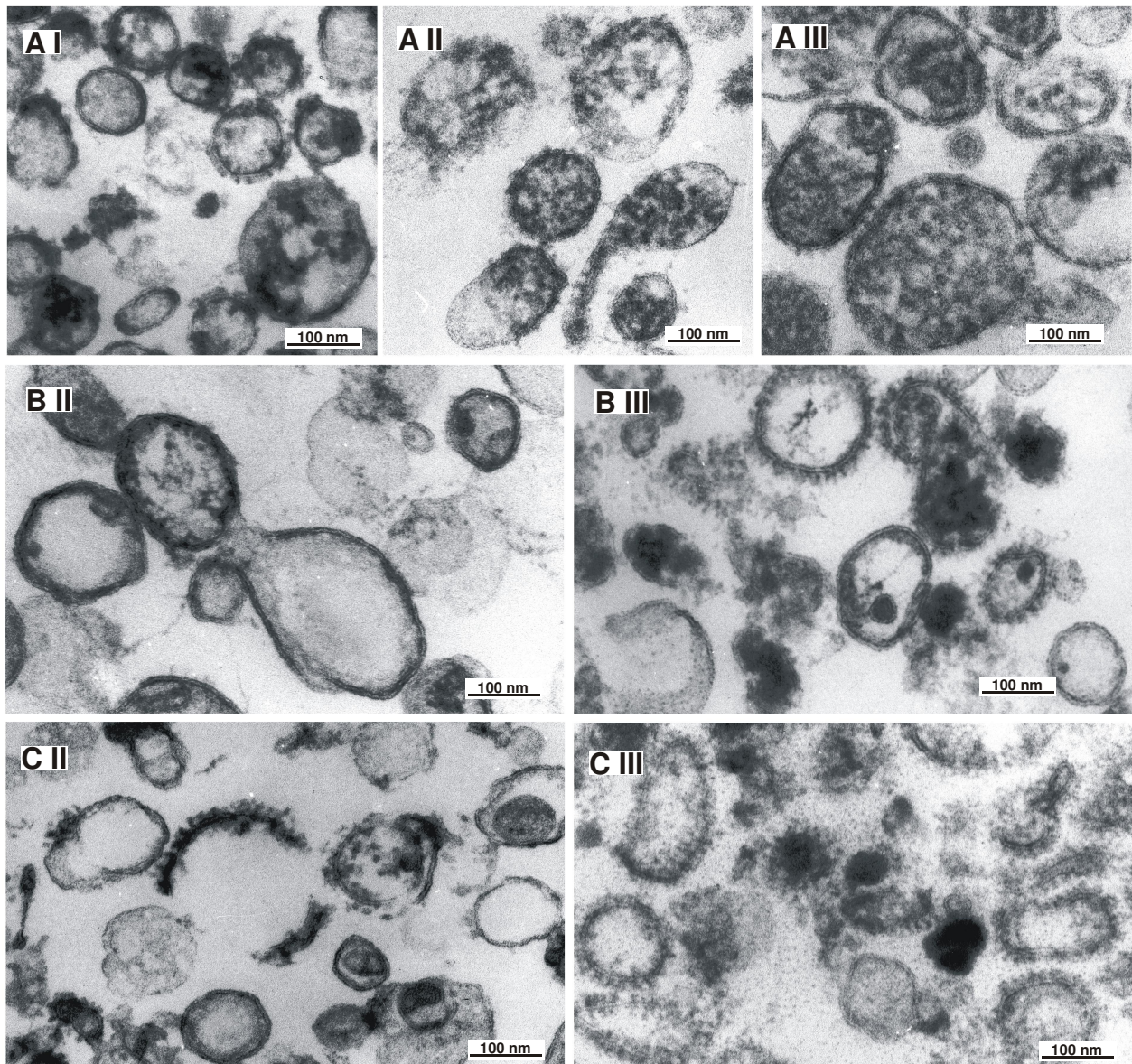
**Abb. 13: RT-nested PCR mit Viruspräparationen aus Kot und AAF.**

I, II, III: Banden der Viruspräparationen nach Aufreinigung durch Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten. GP2: Kot eines experimentell infizierten Graupapageis (*Psittacus erithacus*); GA: Kot eines natürlich infizierten Gelbbrustaras (*Ararauna*); #599: APMV-1 Isolat 599-haltige AAF. M: Molekulargewichtsmarker. +: Positivkontrolle (APMV-1 Stamm Ulster); -: Wasserkontrolle.

Mit Hilfe der Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie wurden die Partikel in den Präparationen aus Kot und AAF anhand der spezifischen Morphologie eindeutig als Paramyxoviren identifiziert (Abb. 14). In allen untersuchten Fraktionen jeder Präparation waren Paramyxovirus-Partikel mit einer Lipid-Doppelschicht und bis zu 15 nm langen Projektionen zu finden. Fraktion III enthielt bei allen Präparationen eindeutig eine größere Anzahl an Partikeln, die mit einem Durchmesser von 120 bis 250 nm gegenüber 90 – 150 nm größer waren als in den Fraktionen I und II. Bei Fraktion I zeigten die Partikel vermehrt eine rundliche Form, während sie in den Fraktionen II und III eine pleomorphe, teilweise längliche Gestalt aufwiesen. Die aus #599-haltiger AAF aufgereinigten Paramyxovirus-Partikel in den Banden II und III (Abb. 14 A II-III) enthielten zum größten Teil das Ribonukleoprotein (RNP) während dieses in Bande I (Abb. 14 A I) bei einigen Partikeln fehlte. Demgegenüber waren sowohl in den Fraktionen II als auch III der Kotpräparationen beider Papageien (Abb. 14 B II-III und C II-III) überwiegend leere Partikel ohne RNP sichtbar, bzw.



wiesen diese Fraktionen einen hohen Anteil an beschädigten Partikeln mit zerstörter Struktur der Lipid-Doppelmembran sowie teilweise freiem RNP auf.



**Abb. 14: Paramyxovirus-Partikel aus AAF und aus Kot von Papageien.** Elektronenmikroskopische Bilder in der Ultradünnschnitt-Technik. Untersucht wurden nach Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten und Einbettung der Viruspräparationen die Banden I, II, III aus virushaltiger AAF (APMV-1 Isolat #599): **A I–III**, die Banden II und III aus Kot eines experimentell infizierten Graupapageis (GP2; *Psittacus erithacus*): **B II–III** und eines natürlich infizierten Gelbbrustaras (GA; *Ara ararauna*): **C II–III**.



## **5. Diskussion**

### **5.1. Charakterisierung von schwach virulenten Papageien-APMV-1-Isolaten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs Papageien-APMV-1-Isolate durch HAH-Tests mit verschiedenen  $\alpha$ -APMV-1-Seren aus Tauben differenziert und anschließend über die Sequenzanalyse des HN-Gens charakterisiert. Dabei wiesen die Papageien-APMV-1-Isolate ein einheitliches Reaktionsmuster mit  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren aus Tauben auf. Serologisch waren sie eindeutig von pPMV-1-Stämmen, nicht jedoch von den Impfstämmen LaSota und B1 abgrenzbar. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen aus vorangegangenen Studien, bei denen umgekehrt demonstriert wurde, dass  $\alpha$ -pPMV-1-Seren aus Tauben präferentiell mit dem homologen (pPMV-1-) Antigen und schwächer mit dem Impfstamm LaSota reagieren (Forster, 2002).

Während alle gegen die Papageien-APMV-1-Isolate gerichteten Seren ein einheitliches Reaktionsprofil aufwiesen, waren bei den gegen pPMV-1 gerichteten Seren Unterschiede im Reaktionsprofil mit heterologen Antigenen festzustellen. Diese beiden Seren stammen von Tieren, die nur einmal mit pPMV-1 infiziert wurden. Im Gegensatz dazu wurden für die Herstellung der  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren aufgrund der gering ausgeprägten Immunantwort Tauben zweimal mit den Papageien-APMV-1-Isolaten inokuliert. Mit dem  $\alpha$ -LaSota-Serum war keine Differenzierung zwischen verschiedenen APMV-1-Antigenen, auch nicht zwischen pPMV-1 und Papageien-APMV-1, zu beobachten. Bei diesem Serum handelt es sich, im Gegensatz zu den restlichen Seren, um das Hyperimmunserum eines mehrfach mit aufgereinigtem und inaktiviertem Virus immunisierten Huhnes. Diese Beobachtungen sind vermutlich auf individuelle Unterschiede bei der Ausbildung der Immunantwort zurückzuführen bzw. durch die Art und Häufigkeit der Immunisierung bedingt (Abbas et al., 1991; Schloer, 1974).

Anhand des Reaktionsprofils mit den polyklonalen  $\alpha$ -APMV-1-Seren ließen sich die Papageien-APMV-1-Isolate nicht von den Impfstämmen LaSota und B1 unterscheiden. Prinzipiell bestehen antigenetische Unterschiede auch zwischen eng verwandten

APMV-1-Stämmen, diese sind aber gering und serologisch nur mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (mAk) nachzuweisen (Alexander et al., 1997a; Russel und Alexander, 1983). So existiert z.B. ein mAk, der zwischen den Impfstämmen B1 und LaSota differenziert (Meulemans et al., 1987). Anhand des Reaktionsmusters mit verschiedenen mAk können APMV-1-Stämme in Gruppen eingeteilt werden. Nach dieser Einteilung werden die Impfstämme B1 und LaSota der mAk-Gruppe E zugeordnet, während pPMV-1-Stämme der mAk-Gruppe P angehören (Alexander et al., 1997a; Russel und Alexander, 1983). Frühere Untersuchungen konnten die Papageien-APMV-1-Isolate aufgrund ihres Reaktionsmusters mit mAk bereits vom Impfstamm LaSota, nicht jedoch von B1 abgrenzen (Grund et al., 2002). Die Papageien-APMV-1-Isolate scheinen also eng mit B1-Impfstämmen verwandt zu sein. Um eine genauere Charakterisierung bzw. Abgrenzung zu B1-Impfstämmen zu ermöglichen, waren molekulare Untersuchungen notwendig. Diese konzentrierten sich v.a. auf die Nukleinsäuresequenz des HN-Protein-Gens, da dieses Hüllglykoprotein aufgrund seiner biologischen und antigenetischen Eigenschaften gut charakterisiert ist. Die molekularen Untersuchungen bestätigten die serologische Abgrenzung der Papageien-APMV-1-Isolate zu pPMV-1-Stämmen auf der Ebene der Nukleinsäuresequenz. Die Papageien-APMV-1-Isolate gruppierten bei phylogenetischen Analysen auf dem HN-Gen, aber auch auf dem F- und L-Gen, stets in die Gengruppe II, in die sowohl der Impfstamm LaSota als auch B1 eingeteilt werden. Ein Vergleich innerhalb der Gengruppe II auf dem HN-Gen zeigte eine engere Verwandtschaft mit B1-, als mit LaSota-Impfstämmen. Abweichungen von einer B1-Konsensus-Sequenz, die ausschließlich bei den Papageien-APMV-1-Isolaten, nicht jedoch bei B1-Impfstämmen vorkommen, wiesen nach, dass es sich nicht um reisolierte B1-Impfstämme handelt. Zudem liegt die Abweichung der Papageien-APMV-1-Isolate von einer B1-Konsensus-Sequenz (0,7 % Divergenz auf der HN-CDS) über der Variabilität innerhalb der Gruppe der B1-Impfstämme, unter denen auf der HN-CDS eine Divergenz von 0,0 – 0,5 % zu einer B1-Konsensus-Sequenz besteht (eigene Untersuchungen). Untereinander zeigen die sechs Papageien-APMV-1-Isolate eine Übereinstimmung der Nukleinsäuresequenz von 99,9 bis 100 %. Bei Untersuchungen der APMV-1-Stämme Hertfordshire und Mukteswar wurde eine Sequenzübereinstimmung von 98,9 bis 100 % mit der Herkunft aus einem

gemeinsamen Stamm erklärt (Czeglédi et al.; 2003). Die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen und Sequenzvergleiche auf dem HN-Gen, aber auch auf dem F- und L-Gen und den intergenischen Bereichen weisen also auf eine Abstammung der Papageien-APMV-1-Isolate von B1-Impfstämmen hin.

Eine sichere Bewertung von Nukleinsäuresequenzen ist allerdings nur möglich, wenn die ermittelten Sequenzen verlässlich sind. Methodische Fehler, die sich durch Kontamination oder Lesefehler bei der Ermittlung der hier vorgestellten Nukleinsäuresequenzen ergeben, konnten aufgrund mitgeführter Kontrollen ausgeschlossen werden. So war die Sequenz des als Kontrolle mitgeführten Impfstammes LaSota identisch mit einer bereits veröffentlichten (Römer-Oberdörfer et al., 1999). Auch die zusätzlich zu Papageien-APMV-1 ermittelten Sequenzen anderer APMV-1-Isolate unterschieden sich von den Papageien-APMV-1-Isolaten und untereinander. Die Nukleinsäuresequenzen der serologisch als pPMV-1 identifizierten Isolate aus Tauben gruppieren in phylogenetischen Analysen auf dem HN-Gen erwartungsgemäß zusammen mit anderen pPMV-1-Stämmen in eine Gruppe. Dies wurde exemplarisch für R72/95 auch auf Teilen der F- und L-CDS bestätigt. Zudem wiesen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Sequenzen der Papageien-APMV-1-Isolate in sich überschneidenden Bereichen (182 Nt) keine Unterschiede (0 % Divergenz) zu separat ermittelten Teilen der F-Gen-Sequenz des Isolats #871 (Grund et al., 1998) auf. Die fünf für die Amplifikation mittels RT-PCR benutzten Primerpaare überlappten sich um insgesamt 785 Nt und jedes der resultierenden Fragmente wurde sowohl in 3'- als auch 5'-Richtung sequenziert. Auch in diesen überlappenden Bereichen waren keine Differenzen festzustellen. Bei jeder durchgeführten RT-PCR wurde eine Negativkontrolle (DEPC-behandeltes *A. bidest.*) mitgeführt. Zusätzlich wurden, um Kontaminationen zu vermeiden, bei der Durchführung der RT-PCR umfangreiche Sicherheitsvorkehrungen getroffen.

Unklar bleibt, wie es zum Eindringen von B1-Impfstämmen in die Papageienpopulation und zur Veränderung dieser Stämme gekommen ist. Denkbar wäre eine Impfung mit anschließender natürlicher Durchseuchung der Bestände. Zwar gibt es keine für Papageien zugelassenen APMV-1-Impfstoffe, jedoch wurde während der II. Panzootie der Newcastle Krankheit Anfang der 70er Jahre die Impfung von Papageien mit Lebendvakzinen für Hühner empfohlen (Lüthgen, 1981; Winteroll und Grimm, 1974).

Eine Vakzinierung von Papageien mit Hühner-APMV-1-Impfstämmen ist in Deutschland bzw. Europa laut Anfragen bei verschiedenen Kollegen und Züchtern keine gängige Praxis. Die APMV-1-Impfung von Wildfängen in den Herkunftsländern vor dem Export kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Neben durchgeführten Impfungen von Papageien ist aber auch eine unbeabsichtigte Ausbreitung von Impfviren aus vakzinierten Hühnerbeständen möglich. Das Eindringen von APMV-1-Impfstämmen in Vogelpopulationen ist bereits beschrieben (Wehmann et al., 1999). So waren lentogene APMV-1-Feldisolate in Kanada und Ungarn mittels Restriktionsenzymanalyse meist identisch mit dem regional verwendeten Impfstamm (Wehmann et al., 1999).

Die beobachteten Veränderungen der Papageien-APMV-1-Isolate zu einer B1-Konsensus-Sequenz können auf die für RNA-Viren typische hohe Rate der Mutation (Domingo und Holland, 1997) zurückgeführt werden. Auch innerhalb der Impfstämme LaSota und B1 sind Variationen nachweisbar (Seal et al., 1996). In Untersuchungen von Seal et al. (1996) wird ein lentogener APMV-1-Stamm beschrieben, der Anfang der 90er Jahre aus Puten isoliert wurde. Aufgrund von Eigenschaften des HN-Proteins sowie Sequenzanalysen kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um einen veränderten B1-Impfstamm handelt (Seal et al., 1996). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass im Vergleich zu den verfügbaren B1-Impfstämmen dieses Isolat die meisten Abweichungen der abgeleiteten Aminosäuresequenz von einer B1-Konsensus-Sequenz auf dem HN-Protein aufweist. Diese Abweichungen treten an Stellen auf, die bei den B1-Impfstämmen konserviert sind und Ausdruck einer speziesspezifischen Adaptation des Virus sein könnten. Auch die abgeleitete Aminosäuresequenz der Papageien-APMV-1-Isolate weist mehr Veränderungen zu einer B1-Konsensus-Sequenz auf als die untersuchten B1-Impfstämme. Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, dass diese Veränderungen, wie bei dem Isolat aus Puten, bei B1-Impfstämmen konserviert sind. Hinweise auf eine Anpassung des Erregers an eine neue Wirtsspezies ergeben sich auch aus Beobachtungen bei Tauben. Diese galten lange Zeit als resistent gegen APMV-1 (Kaschula, 1952; Reuss, 1961; Schoop et al., 1955) und nur subklinische Infektionen waren bekannt (Iyer, 1939). In den 1980er Jahren kam es dann plötzlich zum seuchenhaften Auftreten von APMV-1 bei Tauben. Die dabei isolierten Stämme zeigten antigenetische Unterschiede

zu herkömmlichen APMV-1 und werden daher als APMV-1 vom Taubentyp (pPMV-1) bezeichnet. Veränderungen der abgeleiteten Aminosäuresequenz an diskontinuierlichen neutralisierbaren Epitopen des HN-Proteins sind auch bei APMV-1-Isolaten aus Tauben festzustellen. Fünf als diskontinuierliche neutralisierbare Epitope (156F→Y, 263N→K, 494G→D, 502A→V, 514I→V; Tab. 12) beschriebene Stellen (Abb. 3; Gotoh et al., 1988; Iorio et al., 1986, 1989a, 1991, 1992, 2001; Zaitsev et al., 2004) zeigten Abweichungen von einer B1-Aminosäuren-Konsensussequenz. Die Veränderung an einem weiteren neutralisierbaren Epitop (347E→G; Tab. 12; Abb. 3; Iorio et al., 1991) trat bei allen pPMV-1, nicht aber bei dem APMV-1-Isolat #8226 aus einer Taube auf. Unterschiede innerhalb neutralisierbarer Bereiche traten sogar zwischen den eng verwandten Impfstämmen LaSota und B1 auf. So waren beim Impfstamm LaSota von 5 nachgewiesenen Veränderungen zu einer B1-Konsensussequenz zwei an neutralisierbaren Epitopen (203H→Y, 495E→V; Abb. 3; Gotoh et al., 1988; Iorio et al., 1991) lokalisiert. Diese bei LaSota und den APMV-1-Isolaten aus Tauben „veränderten“ Stellen zeichnen sich insgesamt durch eine hohe Variabilität aus. Demgegenüber traten die bei den Papageien-APMV-1-Isolaten nachgewiesenen Austausche überwiegend an unter den untersuchten APMV-1-Stämmen konservierten Stellen auf. Bemerkenswert sind Austausche von Aminosäuren in der Ektodomaine des HN-Proteins der Papageien-APMV-1-Isolate, welche innerhalb beschriebener (Abb. 3; Iorio et al., 2001) neutralisierender Epitope liegen (199H→R) oder unmittelbar an diese Bereiche angrenzen (522I→V). Abweichungen finden sich bei den Papageien-APMV-1-Isolaten (31L→S) ebenfalls in der transmembranen Region (As 27 bis 48). Die Veränderung im Bereich des HN-Protein-Stiels (87Q→H) liegt innerhalb einer Region (Aminosäure 74 bis 110), welche Einfluss auf die Fusionsaktivität hat (Stone-Hulsander und Morrison, 1999). Es wird angenommen, dass das HN-Protein mit dem F-Protein interagiert (Stone-Hulsander und Morrison, 1997) und dessen Konformation verändert (McGinnes et al., 2002). Auch diese Veränderungen im Bereich der transmembranen Region und des HN-Protein-Stiels sind an Stellen lokalisiert, die bei den hier untersuchten APMV-1-Isolaten konserviert sind. Glykosilierungsstellen (Abb. 3; McGinnes und Morrison, 1995) auf dem HN-Protein waren bei den APMV-1-Isolaten aus Papageien und Tauben nicht von Abweichungen gegenüber einer B1-Konsensussequenz betroffen und auch die Cystein-Brücken

(Abb. 3; Pitt et al., 2000) waren unter diesen Isolaten konserviert. Lediglich an Position 123 war bei den Papageien-APMV-1-Isolaten wie bei den restlichen Stämmen der Gengruppe II (Sakaguchi et al., 1989) kein Cystein vorhanden.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass in Übereinstimmung mit der geringen Virulenz (Grund et al., 2002) der Papageien-APMV-1-Isolate, die abgeleitete Aminosäuresequenz der als Virulenzmarker dienenden F-Protein-Spaltstelle nicht von B1- und LaSota-Impfstämmen abweicht (Grund et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch zusätzlich zu den Veränderungen auf dem HN-Protein auch in anderen Bereichen des F-Proteins der Papageien-APMV-1-Isolate Abweichungen von einer B1-Konsensus-Sequenz beobachtet, die sich auf die Fusionsaktivität auswirken könnten. So befindet sich eine Abweichung (525L→I) innerhalb der transmembranen Region des F-Proteins (Position 496 bis 526; Morrison, 2003). Zwei Veränderungen sind in einem als zweites Fusionspeptid identifizierten Bereich (Position 221 bis 230; Peisajovich et al., 2000; Samuel und Shai, 2001) lokalisiert (226T→I) oder grenzen unmittelbar daran an (231N→S). Auch wenn nach etablierten Kriterien die beobachteten Veränderungen nicht auf eine Pathogenität für Hühnervögel hinweisen, ist ein Gefährdungspotential nicht grundsätzlich auszuschließen. Experimentell konnte z.B. nach mehrmaliger Passage von nicht aus Hühnervögeln stammenden APMV-1-Isolaten in Hühnern eine Virulenzsteigerung beobachtet werden (Shengqing et al., 2002). Epidemiologische Beobachtungen aus Irland und Australien belegen zudem, dass die stufenweise Durchseuchung einer Population mit lentogenen Viren zu Veränderungen geführt hat, die mit Virulenzsteigerungen verbunden waren (Alexander et al., 1992; McNulty et al., 1988; Collins et al., 1993, 1998; Gould et al., 2001; Westbury et al., 2001). Auch wenn es bisher keine Berichte über die Entstehung hoch virulenter APMV-1-Stämme aus Lebendimpfstoffen gibt, sollte trotzdem der potentiellen Gefährdung durch eine Vakzinierung von Papageien mit heterologen Hühner-Lebendimpfstämmen Rechnung getragen werden und unterbleiben. Dies ist insbesondere geboten, um bei der langen Lebenszeit von Psittaziden eine unkontrollierte Ausbreitung von Impfstämmen in der Papageienpopulation zu unterbinden.

Die aus den Ergebnissen der Charakterisierung von Papageien-APMV-1-Isolaten abgeleiteten Aussagen sind auf die untersuchten sechs Isolate limitiert. Analysen von

Nukleinsäuresequenzen weiterer schwach virulenter APMV-1 aus Papageien sind notwendig, um Informationen zur generellen Verbreitung von B1-Impfstämmen bei subklinischen APMV-1-Infektionen von Psittaziden zu erhalten. Dabei wird eine direkte Amplifikation der viralen RNA mittels RT-PCR aus Probenmaterialien wie z.B. Kot angestrebt.

## **5.2 Nachweis von nichtinfektiösen Paramyxovirus-Partikeln im Kot von Papageien**

Basierend auf den durchgeführten Sequenzanalysen der Papageien-APMV-1-Isolate wurde im zweiten Teil der Arbeit erfolgreich eine sensitive RT-nested PCR etabliert. Diese Nachweismethode sollte nach Sequenzierung der Amplifikationsprodukte eine direkte Analyse von mit dem Kot ausgeschiedenen APMV-1 ermöglichen. Allerdings war es mit dieser RT-nested PCR nicht möglich, in Kotproben von Papageien-Patienten, in denen elektronenmikroskopisch Paramyxovirus (PMV-) ähnliche Partikel beobachtet worden waren, virale RNA des APMV-1 nachzuweisen. Weiterführende Untersuchungen waren darauf ausgerichtet, etwaige Störfaktoren zu ermitteln bzw. zu minimieren.

Die erfolgreiche RNA-Isolierung ist Voraussetzung für die erfolgreiche Amplifikation viraler RNA mittels RT-PCR. Dabei spielt das Probenmaterial und die Herkunft der zu isolierenden viralen RNA eine Rolle. Beispielsweise war beim Nachweis viraler RNA des Hepatitis C (HCV) und Hepatitis G Virus (HGV) mittels RT-PCR aus Serumproben die Phenol-Chloroform-Extraktion zehnfach sensitiver im Vergleich zum QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Kit (Fanson et al., 2000), während bei einer Denguevirus RT-PCR (De Paula et al., 2001) die RNA-Extraktion mit dem QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Kit sensitiver war. Nach den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen war die RT-PCR nach Isolierung viraler APMV-1 RNA aus Kot von Papageien mit dem QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Kit um das Zehnfache sensitiver als nach RNA-Isolierung mit einer auf der Phenol-Chloroform-Extraktion basierenden Methode (peqGOLD RNA Pure<sup>™</sup>FL; Chomczynski und Sacchi, 1987). Bei der RT-nested PCR wurde deshalb der für das

hier getestete System am besten geeignete QIAamp® Viral RNA Kit zur RNA-Extraktion benutzt.

Der Nachweis viraler RNA mit der hier benutzten RT-PCR war aus AAF bis 191,8 EID<sub>50</sub> (pro 140 µl Ansatz) möglich. Damit war die Nachweisgrenze niedriger, als bei Untersuchungen aus Präparationen von Lebendvakzinen, bei denen mit einer RT-PCR bis zu  $5 \times 10^2$  EID<sub>50</sub> APMV-1 detektiert werden konnten (Stäuber et al., 1995). Aus Kot von Papageien konnte virale RNA jedoch nur bis  $191,8 \times 10^3$  EID<sub>50</sub> nachgewiesen werden. Der negative Effekt von Kot auf die RT-PCR ist auch für Rotaviren und HIV-1 von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Hoek et al., 1995; Wilde et al., 1990). Als PCR-Inhibitoren in Fäzes konnten u.a. komplexe Polysaccharide ermittelt werden (Monteiro et al., 1997). Grundsätzlich ist jedoch ein Nachweis viraler RNA des APMV-1 auch aus Kotproben möglich (Gohm et al., 2000; Barbezange, 2002).

Durch Steigerung der Sensitivität mittels Einführung eines weiteren PCR-Schrittes (→ RT-nested PCR) konnte in „Spiking“-Experimenten der negative Einfluss von Papageienkot auf die RT-PCR zumindest für das untersuchte System kompensiert werden. Damit wurde die Nachweisesgrenze von APMV-1-RNA aus Papageienkot um den Faktor  $10^5$  auf 13,7 EID<sub>50</sub>/ml gesteigert, und es bestand kein Unterschied mehr zur Nachweisgrenze aus Papageien-APMV-1 enthaltender AAF. Frühere Untersuchungen mit einer Real-Time RT-PCR (RRT-PCR) konnten für APMV-1 eine Nachweisgrenze von 10 EID<sub>50</sub> ermitteln (Wise et al., 2004).

Grundsätzlich ist die Variabilität der APMV-1-Stämme auf dem HN-Gen für die Nachweisbarkeit mittels RT-nested PCR zu berücksichtigen. Ein Scheitern der RT-nested PCR aufgrund von Sequenzunterschieden an der Primerbindungsstelle ist jedoch für die untersuchten Kotproben eines experimentell infizierten Graupapageien GP2 (*Psittacus erithacus*; Grund, 2004) auszuschließen. Für die Infektion dieses Tieres wurde das mit der RT-nested PCR sicher nachweisbare Papageien-APMV-1-Isolat #599 verwendet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von APMV-1-RNA mit der etablierten RT-nested PCR nicht auf B1-Impfstämme bzw. auf Vertreter der Gengruppe II beschränkt ist. Als Spezifitätsnachweis wurden APMV-1-Isolate aus drei unterschiedlichen, z.T. phylogenetisch weit entfernten Gengruppen amplifiziert und anschließend direkt sequenziert. Die Sequenzen von LaSota (Gengruppe II), Ulster (Gengruppe I) und R72/95 (Gengruppe pPMV-1) ergaben dabei



die erwarteten Ergebnisse. Das negative Ergebnis der RT-nested PCR aus den untersuchten Kotproben ist auch nicht auf eine niedrigere Sensitivität im Vergleich zur elektronenmikroskopischen Untersuchung zurückzuführen. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung geht man für APMV-1 von einer Nachweisgrenze von ca.  $10^6$  bis  $10^7$  Partikel/ml aus (Gelderblom et al., 1991). Bei der Sensitivität der RT-nested PCR von 13,7 EID<sub>50</sub>/ml wäre demnach auch bei einem sehr ungünstigen Verhältnis von ca. 73.000 Partikeln pro EID<sub>50</sub> noch ein Nachweis in der RT-nested PCR möglich.

Die bisherigen Ergebnisse führten zu der Überlegungen, dass entweder freie PCR-Inhibitoren im Kot (siehe oben) zu den negativen Ergebnissen der RT-nested PCR aus den untersuchten Kotproben geführt hatten oder der Gehalt an viraler RNA in diesen Proben verringert war.

Da nach präparativer Aufreinigung von viralen Partikeln in zwei elektronenmikroskopisch PMV-positiven Kotproben (darunter von GP2) mittels RT-nested PCR keine RNA des APMV-1 nachgewiesen werden konnte, während Präparationen aus Papageien-APMV-1-haltiger AAF (#599) positiv waren, kann davon ausgegangen werden, dass freie PCR-Inhibitoren nicht dominierend am negativen Ergebnis der RT-nested PCR aus den untersuchten Kotproben beteiligt waren.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Ultradünnschnitt lassen den Schluss zu, dass eher ein geringer Gehalt an viraler RNA in den Kotproben einen Nachweis mittels RT-nested PCR verhindert hat. Im Vergleich zur Referenz (#599-AAF) waren in Kotpräparationen vermehrt defekte bzw. leere Paramyxovirus-Partikel ohne Nukleoprotein (NP) sichtbar. Das NP bildet das Nukleokapsid, das die virale RNA umschließt (Hamaguchi et al., 1983 und 1985). Ein reduzierter Gehalt des NP deutet somit auf einen geringeren Gehalt an viraler RNA. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der RT-nested PCR aus den untersuchten Kotproben und Viruspräparationen. Auf einen verringerten Gehalt an NP weisen auch biochemische Befunde von Grund (2004). Die aus Kot eines natürlich infizierten Graupapageien (GP4) aufgereinigten Partikel waren mittels Western Blot (WB) Analyse als APMV-1 zu identifizieren, wiesen jedoch einen verringerten Gehalt an NP auf. Das vermehrte Auftreten von leeren Partikeln in Kotproben und die negative RT-nested PCR erklären auch die nicht nachweisbare Infektiosität. So war aus keiner der

Kotproben auf embryonierten SPF Hühnereiern Virus anzuzüchten. Auf eine geringe Infektiosität in vivo deuten Beobachtungen im Rahmen von Infektionsversuchen. Dabei konnte trotz Vergesellschaftung eines Sentineltiers, Graupapagei 5 (GP5), mit einem experimentell infizierten Graupapagei 2 (GP2) über 89 Wochen trotz nachgewiesener Virusausscheidung des GP2 keine Übertragung beobachtet werden (Grund, 2004).

Derartige nichtinfektiöse Partikel sind sowohl bei RNA- (Schnitzer und Lodish, 1979 u.a.) als auch DNA-Viruspezies (Altstein et al., 1967; DeMarchi et al., 1979 u.a.) beschrieben. Für das Humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung der viralen Protease nichtinfektiöse Partikel gebildet werden (Kaplan et al., 1993). Sogenannte nichtinfektiöse subvirale Partikel (SVP) sind auch für Hepadnaviren beschrieben (Ganem, 1991). Diese können auch eine Modulation des Infektionsgeschehens bewirken. Für das Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV) konnte z.B. eine infektionssteigernde Wirkung von SVP, die entweder über eine Transaktivierung der Translation oder andere Signalkaskaden nach Bindung an zelluläre Rezeptoren ausgelöst wird, nachgewiesen werden (Bruns et al., 1998). Auch für APMV-1 ist das Auftreten so genannter defekter oder nichtinfektiöser Partikel (NIP) bereits beschrieben (Rott et al., 1962), galt aber bisher als Phänomen bei Zellkulturen (Fraser et al., 1976). Derartige Partikel können über Dichtegradienten-Zentrifugation angereichert werden (LaMontagne et al., 1975). Dabei konnte exemplarisch gezeigt werden, dass der Gehalt an NIP bei dem lentogenen Stamm Beaudette (10 – 20 % NIP) gegenüber dem velogenen Stamm Italia (0,5 – 2,5 %) erhöht ist (Rott et al., 1963).

Ob die beobachteten leeren Partikel durch Prozesse während der Replikation, der Morphogenese oder der Freisetzung entstehen und damit primär zur Entstehung von NIP führen, oder ob es zu einer Zerstörung der Virione während des Digestionsvorganges kommt, bleibt unklar. Untersuchungen von Organproben subklinisch APMV-1 infizierter Papageien sind nötig, um die Entstehung von NIP aufzuklären. In der Zwischenzeit ist für die Diagnose der Erregerausscheidung mit dem Kot bei subklinischen APMV-1-Infektionen von Papageien weiterhin der Nachweis über die Elektronenmikroskopie die Methode der Wahl.

Das Auftreten von NIP könnte in direktem Zusammenhang mit beobachteten subklinisch persistierenden APMV-1-Infektionen von Papageien stehen. Dabei wäre

---

folgendes Modell denkbar: Durch die herabgesetzte freie Infektiosität wäre eine Ausbreitung der Infektion im Wesentlichen auf eine Zell- zu Zellübertragung beschränkt. Eine daraus resultierende lokal begrenzte Infektion, würde demnach zu minimalen Schädigungen ohne klinische Manifestation führen. Die dabei auftretende geringe Produktion von freien Tochtervirionen würde aber auch nur zu einer schwachen Stimulation des Immunsystems führen und damit eine effiziente Immunabwehr mit Elimination des Erregers unterlaufen.

Aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die bei subklinischen APMV-1 Infektionen von Papageien mit dem Kot ausgeschiedenen Partikel von geringer Infektiosität sind. Eine Übertragung des Virus über den Kot ist deshalb wenig wahrscheinlich. Das Auftreten von APMV-1 Infektionen in Papageien-Nachzuchten (Grund, 2004) deutet in der augenblicklichen Situation auf die Möglichkeit einer Übertragung von Elterntieren auf Jungvögel. In diesem Zusammenhang sind als Infektionswege die Kropffütterung und die für APMV-1 beschriebene Eiübertragung (Chen und Wang, 2002; Capua et al., 1993; Fontaine et al., 1964) in Betracht zu ziehen.

## 6. Zusammenfassung

Subklinische APMV-1-Infektionen von Papageien mit einer protrahierten Erregerausscheidung über Monate werden im Zusammenhang mit einer Faktorenkrankheit bei Papageien diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten sechs schwach virulente Papageien-APMV-1-Isolate, die mit einem subklinischen Infektionsverlauf assoziiert sind, weiterführend antigenetisch sowie auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Zusätzlich sollten weitere Untersuchungen Aussagen über die Eigenschaften der von subklinisch APMV-1 infizierten Papageien mit dem Kot ausgeschiedenen Erreger ermöglichen.

Serologische Untersuchungen im Hämagglutinations-Hemmungs-Test (HAH) mit hergestellten Seren die gegen die sechs Papageien-APMV-1-Isolate gerichtet waren, wiesen eine einheitliche Reaktivität der Papageien-APMV-1-Isolate auf. Wie mit den Impfstämmen B1 und LaSota lagen die Abweichungen der  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren vom homologen Antigen unter 1,5 Titerstufen ( $\log_2$ ). Alle  $\alpha$ -Papageien-APMV-1-Seren reagierten jedoch deutlich (2 bis 5 Titerstufen) geringer mit einem pPMV-1-Taubenimpfstamm als mit dem jeweils homologen Antigen.

Die molekulare Charakterisierung basierte auf der Sequenzanalyse von 5, auf einer Länge von 785 Nukleotiden überlappenden RT-PCR-Fragmenten (Position 5977 bis 8655 der genomischen RNA), die das HN-Gen, Teile der Fusions- (F-) und Large- (L-) Gene sowie die intergenischen Bereiche beinhalteten. Die sechs Papageien-APMV-1-Isolate zeigten untereinander eine Übereinstimmung der generierten Nukleinsäuresequenzen. Phylogenetische Analysen gruppieren die Papageien-APMV-1-Isolate auf allen drei untersuchten Genen (HN-, F- und L-Gen) in die APMV-1-Gengruppe II, in die auch die Impfstämme LaSota und B1 eingeordnet sind. Die höchste Homologie der Papageien-APMV-1-Isolate trat zum Impfstamm B1 auf. Es waren jedoch bei den Papageien-APMV-1-Isolaten gegenüber einer B1-Konsensus-Sequenz Nukleotid-Abweichungen festzustellen (HN-Gen: 14; F-Gen: 12 ab Nukleotidposition 247), die an 8 (HN-CDS) bzw. 4 (ab Position 201 der F-CDS) Stellen zu Aminosäureveränderungen führten. Jeweils 11 Nukleotidveränderungen auf dem HN-Gen und F-Gen (ab Nukleotid 247) traten bei verfügbaren B1-Impfstämmen nicht auf.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine RT-nested PCR etabliert, die mit einer experimentell mit einem Papageien-APMV-1-Isolat vermischten Kotprobe eine Sensitivität von 13,7 EID<sub>50</sub>/ml erzielte. In Kotpräparationen eines experimentell mit einem Papageien-APMV-1-Isolat infizierten Graupapageien (*Psittacus erithacus*) bzw. von natürlich APMV-infizierten Papageien (n=13) gelang der Nachweis viraler RNA mit der RT-nested PCR jedoch nicht. In allen Kotproben waren elektronenmikroskopisch paramyxovirusartige Partikel nachweisbar, die allerdings aufgrund negativer Kultivierungsversuche in der Eikultur als nicht infektiös anzusprechen sind. Durch Dichtegradienten-Zentrifugation konnten sowohl aus Kotproben des experimentell infizierten Graupapageien als auch eines natürlich APMV-infizierten Papageien virale Partikel aufgereinigt werden. Aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen im Ultradünnschnitt waren diese Viruspartikel morphologisch eindeutig als Paramyxoviren zu identifizieren. Im Vergleich zu einem in der Eikultur vermehrten Papageien-APMV-1-Isolat, wiesen die Kotpräparationen jedoch vermehrt defekte Partikel auf, bei denen das Nukleokapsid fehlte. In diesen durch die Aufreinigung angereicherten Virusproben aus Kot gelang es mit der RT-nested PCR erneut nicht virale RNA nachzuweisen.

Der Nachweis von Paramyxovirus-Partikeln ohne Nukleokapsid bzw. virale RNA im Kot von Papageien deutet auf das Auftreten von sogenannten nichtinfektiösen Partikeln (NIP) in vivo. Dieses für APMV-1 bisher nur aus persistent infizierten Gewebekulturen bekannte Phänomen könnte aufgrund der herabgesetzten freien Infektiosität in direktem Zusammenhang mit beobachteten subklinisch persistierenden APMV-1-Infektionen von Papageien stehen. Eine Übertragung des Virus mit dem Kot ist wenig wahrscheinlich. Eher in Betracht zu ziehen wäre eine Infektion durch direkten Kontakt, wie sie beim „Schnäbeln“ bzw. bei der Kropffütterung gegeben ist. Untersuchungen an Gewebeproben müssen dieses Modell abklären. Dazu steht mit der etablierten RT-nested PCR ein sensitives Untersuchungsverfahren zur Verfügung, das zudem eine schnelle Charakterisierung bzw. Differenzierung der auftretenden APMV-1-Genotypen ermöglicht. Für die Diagnose der Erregerausscheidung mit dem Kot bei subklinischen APMV-1-Infektionen von Papageien ist jedoch weiterhin der Nachweis über die Elektronenmikroskopie die Methode der Wahl.

## 7. Summary

### **Characterization of avian paramyxovirus serotype 1 (APMV-1) parrot-isolates and demonstration of non-infectious paramyxovirus-particles in feces of subclinically APMV-1-infected psittacines**

Subclinical APMV-1-infection of parrots with protracted excretion of virus is discussed in correlation with concurrent multifactorial disease.

In the present study six parrot-APMV-1 isolates of low virulence and associated with a subclinical course of infection are characterized antigenically as well as on a molecular level. Additionally, this study produces insights into the properties of particles excreted in feces of subclinically APMV-1-infected parrots.

Serological studies by haemagglutination-inhibition (HI) test using produced antisera against the six parrot-APMV-1 isolates showed a homogeneous reactivity among the parrot-APMV-1 isolates. As with the vaccine-strains B1 and LaSota, variations of the  $\alpha$ -parrot-APMV-1 sera from the homologue antigen were below 1,5 log 2. However, all  $\alpha$ -parrot-APMV-1 sera reacted clearly less intensely (2 to 5 log 2) with a pPMV-1-pigeon-vaccine strain than with the respective homologous antigen.

Molecular characterization was based on sequence analyses of 5 overlapping (overlap of 785 nucleotides) RT-PCR fragments (position 5977 to 8655 of the genomic RNA), comprising the HN-protein gene, parts of the Fusion- (F-) and Large- (L-) protein genes as well as the intergenic regions. The six parrot-APMV-1 isolates showed agreement of the generated nucleic acid sequences. Phylogenetic analyses of the three genes (HN-, F- and L-gene) classified the parrot-APMV-1 isolates into the APMV-1-genotype II together with vaccine strains LaSota and B1. Parrot-APMV-1 isolates showed the closest relationship with vaccine strain B1. However, variations in the parrot-APMV-1 isolates to a generated B1-consensus sequence were detected (HN-protein-gene: 14 basepairs (bp); F-protein-gene: 12 bp starting at nucleotide-position 247), leading to amino acid substitutions at 8 positions on the HN-CDS and 4 positions on the F-CDS (starting at nucleotide 201). Eleven nucleotide substitutions on the HN-

and 11 on the F-protein-gene (starting at nucleotide 247 of the F-CDS) did not occur in published sequences of B1-vaccine strains available.

Based on these results an RT-nested PCR was established that was capable of detecting 13,7 EID<sub>50</sub>/ml of a parrot-APMV-1 isolate in experimentally “spiked” fecal samples from parrots. However, by the established RT-nested PCR viral RNA was neither detectable in fecal samples from a Grey parrot (*Psittacus erithacus*), experimentally infected with parrot-APMV-1-isolate #599 nor in fecal samples from naturally APMV-1-infected parrots (n=13). Electron-microscopic examinations identified paramyxovirus-like particles in all fecal samples. Because of negative cultivation-attempts in egg-culture the particles can be referred to as non-infectious. Viral particles purified by sucrose-gradient centrifugation of fecal samples from the experimentally infected Grey Parrot and one naturally APMV-1-infected parrot were morphologically identified as paramyxoviruses by ultrathin-section electron-microscopy. Compared to a parrot-APMV-1 isolate propagated in egg-culture, the preparations from feces contained more particles that were defective or lacking the nucleocapsid. It was not possible to detect viral RNA by RT-nested PCR in the preparations of virus particles purified from fecal samples.

Evidence of paramyxovirus-particles without a nucleocapsid and/or without viral RNA in the feces of parrots points to the presence of so called non-infectious particles (NIP) in vivo. For APMV-1 the occurrence of NIP is only recorded for persistently infected cell-cultures. Because of their reduced free infectivity, NIPs could be directly associated with observed subclinical persistent APMV-1-infections of parrots. Infection through direct contact, as in crop-feeding or „billing“, is therefore more likely than transmission of the virus by fecal excretion. Examinations of tissue-samples are needed to clarify this model further. With the established RT-nested PCR a sensitive method is now available to detect, characterize and differentiate occurring APMV-1-genotypes. However, for the diagnosis of fecal virus-excretion by subclinically APMV-1-infected parrots, detection by electron-microscopy remains the method of choice.

## 8. Literaturverzeichnis

1. 92/66/EWG. Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaft vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle-Krankheit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 1992;L260:1-20.
2. 93/152/EWG. Entscheidung der Kommission vom 8. Februar 1993 über die Kriterien für Impfstoffe für Routineimpfungen gegen die Newcastle-Krankheit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 1993;L59:35.
3. 2000/666/EG. Entscheidung der Kommission vom 16. Oktober 2000 zur Festlegung der Veterinärbedingungen und Veterinärbescheinigungen sowie Quarantänebedingungen für die Einfuhr von anderen Vogelarten als Geflügel. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 2000;L278:26-34.
4. ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company 1991.
5. ABENES G, KIDA H, YANAGAWA R. Antigenic mapping and functional analysis of the F protein of the Newcastle disease virus using monoclonal antibodies. Arch. Virol. 1986;90:97-110.
6. ABOLNIK C, HORNER RF, BISCHOP SPR, PARKER ME, ROMITO M, VILJOEN GJ. A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. Arch. Virol. 2004;149:603-619.
7. ALDOUS EW, COLLINS MS, MCGOLDRICK A, ALEXANDER DJ. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. Vet. Microbiol. 2001;80:201-213.
8. ALDOUS EW, MYNN JK, BANKS J, ALEXANDER DJ. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian Pathol. 2003;32:239-257.



9. ALDOUS EW, FULLER CM, MYNN JK, ALEXANDER DJ. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (pPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons. *Avian Pathol.* 2004;33:258-269.
10. ALEXANDER DJ, ALLAN WH, SILLARS T. Isolation of myxoviruses from dead birds arriving at Heathrow airport, London. *J. Hyg.* 1977;79:243-247.
11. ALEXANDER DJ, RUSSELL PH, PARSONS G, ABU ELZEIN EM, BALLOUGH A, CERNIK K, ENGSTROM B, FEVEREIRO M, FLEURY HJA, GUITTET M, KALETA EF, KIHM U, KÖSTERS J, LOMNICZI B, MEISTER J, MEULEMANS G, NEROME K, PETEK M, POKOMUNSKI S, POLTEN B, PRIP M, RICHTER R. Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons-an international collaborative study. *Avian Pathol.* 1985;14:365-376.
12. ALEXANDER DJ. The classification, host range and distribution of avian paramyxoviruses. In: *Acute virus infections of poultry*. Eds.: McFerran JB, McNulty MS. Dordrecht: Martinus Nijhoff 1986:52-66.
13. ALEXANDER DJ, MANVELL RJ, KEMP PA, PARSONS G, COLLINS MS, BROCKMAN S, RUSSELL PH, LISTER SA. Use of monoclonal antibodies in the characterization of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. *Avian Pathol.* 1987;16:553-565.
14. ALEXANDER DJ. Newcastle disease. In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. Eds.: Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE. 3 ed. Kennet Square: American Association of Avian Pathologists 1989;27:114-123.
15. ALEXANDER DJ, CAMPBELL G, MANVELL RJS, COLLINS MS, PARSONS G, MCNULTY MS. Characterization of an antigenically unusual virus responsible for two outbreaks of Newcastle disease in the Republic of Ireland in 1990. *Vet. Rec.* 1992;25:68.

16. ALEXANDER DJ, MANVELL RJ, LOWINGS JP, FROST KM, COLLINS MS, RUSSELL PH, SMITH JE. Antigenic diversity and similarities in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.* 1997a;26:399-418.
17. ALEXANDER DJ. Newcastle disease and other avian *paramyxoviridae* infections. In: *Diseases of Poultry*. Eds.: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald L, Saif YM. 10 ed. Ames, IA: Iowa State University Press 1997:541-569.
18. ALEXANDER DJ, BANKS J, COLLINS MS, MANVELL RJ, FROST KM, SPEIDEL EC, ALDOUS EW. Antigenic and genetic characterization of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Vet. Rec.* 1999;145:417-421.
19. ALEXANDER DJ. Newcastle disease. *British Poultry Science* 2001;42:5-22.
20. ALTSTEIN AD, SARYCHEVA OF, DODONOVA NN. Detection of defective (T-antigen inducing, but non-infectious) particles in preparations of SV40 virus. *Virology* 1967;33:744-746.
21. BALLAGI-PORDÁNY A, WEHMANN E, HERCZEG J, BELÀK S, LOMNICZI B. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Arch. Virol.* 1996;141:243-261.
22. BARBEZANGE C, JESTIN V. Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. *J. Virol. Meth.* 2002;106:197-207.
23. BARBEZANGE C, JESTIN V. Molecular characterization of three avian paramyxovirus type 1 isolated from pigeons in France. *Virus Genes* 2003;26(2):175-183.
24. BEARD CW, HANSON RP. Newcastle disease. In *Diseases of poultry*. Eds.: Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW, 8 ed. Ames, IA: Iowa State University Press 1984:452-470.
25. BGBl. Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit (Geflügelpestverordnung). 2004:930ff.

26. BRUNNING-FANN C, KANNEENE J, HEAMON J. Investigation of an outbreak of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet birds in Michigan, Indiana, Illinois and Texas. *JAVMA* 1992;201:1709-1714.
27. BRUNS M, MISKA S, CHASSOT S, WILL H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J. Virol.* 1998;72:1462-1468.
28. CAPUA I, SCACCHIA M, TOSCANI T, CAPORALE V. Unexpected isolation of virulent Newcastle disease from commercial embryonated fowl eggs. *J. Vet. Med. B* 1993;40:609-612.
29. CHAMBERS P, MILLAR NS, EMMERSON PT. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 1986;67:2685-2694.
30. CHEN L, COLMAN PM, COSGROVE LJ, LAWRENCE MC, LAWRENCE LJ, TULLOCH PA, GORMAN JJ. Cloning, expression and crystallization of the fusion protein of Newcastle disease virus. *Virology* 2001;290:290-299.
31. CHEN JP, WANG CH. Clinical epidemiological and experimental evidence for the transmission of Newcastle disease virus through eggs. *Avian Diseases* 2002;46:461-465.
32. CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-159.
33. COLLINS MS, ALEXANDER DJ, BROCKMAN S, KEMP PA, MANVELL RJ. Evaluation of mouse monoclonal antibodies raised against an isolate of the variant avian paramyxovirus type 1 responsible for the current panzootic in pigeons. *Arch. Virol.* 1989;104:53-61.
34. COLLINS MS, BASHIRUDDIN JB, ALEXANDER DJ. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch. Virol.* 1993;128:363-370.

35. COLLINS MS, STRONG I, ALEXANDER DJ. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses". *Arch. Virol.* 1994;134:403-411.
36. COLLINS MS, FRANKLIN S, STRONG I, MEULEMANS G, ALEXANDER DJ. Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. *Avian Pathol.* 1998;27:90-96.
37. COLMAN PM. Influenza virus neuraminidase: Structure, antibodies and inhibitors. *Protein Science* 1994;3:1687-1696.
38. CONNARIS H, TAKIMOTO T, RUSSELL R, CRENNELL S, MOUSTAFA I, PORTNER A, TAYLOR G. Probing the sialic acid binding site of the haemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion. *J. Virol.* 2002;76:1816-1824.
39. COREY EA, MIRZA AM, LEVANDOWSKY E, IORIO RM. Fusion deficiency induced by mutations at the dimer interface in the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase is due to a temperature-dependent defect in receptor binding. *J. Virol.* 2003;77:6913-6922.
40. CRENNELL S, TAKIMOTO T, PORTNER A, TAYLOR G. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus haemagglutinin-neuraminidase. *Nature structural biology* 2000;7:1068-1074.
41. CZEGLÉDI A, WEHMANN E, LOMNICZI B. On the origin and relationship of Newcastle disease virus vaccine strain Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts'33. *Avian Pathol.* 2003;32:271-276.
42. DE LEEUW OS, PEETERS B. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: Evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* 1999;80:131-136.
43. DEMARCHI JM, BEN-PORAT T, KAPLAN AS. Expression of the genome of non-infectious particles in stocks of standard and defective, interfering pseudorabies virions. *Virology* 1979;97:457-463.

44. DENG RT, WANG ZY, MIRZA AM, IORIO RM. Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike. *Virology* 1995;209:457-469.
45. DE PAULA SO, NUMES C, MATOS R, MACHADO DE OLIVIERA Z, LIMA DM, DA FONSECA BAL. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 2001;98:119-125.
46. DOMINGO E, HOLLAND JJ. RNA virus mutations for fitness and survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 1997;51:151-178.
47. DOYLE TM. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *J. Comp. Path. Therap.* 1927;40:144-169.
48. DUESBERG PH, ROBINSON WS. Isolation of the nucleic acid of Newcastle disease virus (NDV). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1965;4:794-800.
49. EHRSAM H, HOMBERGER F, LOTT-STOLZ G. Newcastle disease (atypische Geflügelpest) bei in der Schweiz importierten Papageien. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1975;117:547-555.
50. ERDEI J, BACHIR K, KALETA EF, SHORTRIDGE KF, LOMNICZI B. Newcastle disease vaccine (LaSota) specific monoclonal antibody. *Arch. Virol.* 1987;96:265-269.
51. ERICKSON GA, MARÉ CJ, GUSTAFSON GA, MILLER LD, PROCTOR SJ, CARLIER MC. Interaction between viscerotropic velogenic Newcastle disease virus and pet birds of six species. I. Clinical and serological responses and viral excretion. *Avian Diseases* 1977;21:642-654.
52. FANSON BG, OSMACK P, DI BISCEGLIE AM. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *J. Virol. Meth.* 2000;89:23-27.
53. FONTAINE MP, FONTAIN M, CHABAS D, BRION AJ. Presence of a Newcastle disease-like agent in chicken embryo cells. *Avian Diseases* 1964;9:1-7.

54. FORSTER K, SCHMELLEKAMP A, SCHRIERS C, GRUND CH. Antigene Differenzierung des Taubentyp Paramyxovirus 1 (pPMV-1 und Newcastle Disease Virus (NDV) nach Infektion bzw. Immunisierung von Tauben. 13. DVG-Tagung Vogelkht., München, 21.-22. Februar 2002;139-146.
55. FOURNIER P, ZENG J, VON DER LIETH C, WASHBURN B, AHLERT T, SCHIRRMACHER V. Importance of serine 200 for functional activities of the hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus. *Int. J. Onc.* 2004;24:623-634.
56. FRASER G, EDWARDS HH, MCNULTY MS, RUBEN JMS. Accidental persistent infection of cell lines by Newcastle disease virus, showing three unusual features-defective neuraminidase, temperature sensitivity and intranuclear inclusion. *Arch. Virol.* 1976;50:147-157.
57. GANEM, D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991;168:61-83.
58. GELDERBLOM HR, HAUSMANN EHS, ÖZEL M, WINKEL T, PAULI G, KOCH MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV), immunolocalization of structural proteins and virus-cell interaction. *Micron Microscopica* 1988;19:41-60.
59. GELDERBLOM HR, RENZ H, ÖZEL M. Negative staining in diagnostic virology. *Micron Microscopica* 1991;22:435-447.
60. GERLACH H. Viruses. In: *Avian Medicine: principles and application*. Eds.: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LP. Lake Worth, Fl.: Wingers Publ. Inc. 1994:862-948.
61. GLICKMAN RL, SYDDALL RJ, IORIO RM, SHEEHAN JP, BRATT MA. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J. Virol.* 1988;62:354-356.
62. GOHM DS, THÜR B, HOFMANN MA. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathol.* 2000;29:143-152.

63. GOLDHAFT TM. Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1980;24:297-301.
64. GOTOH B, SAKAGUCHI T, NISHIKAWA K, INOCENCIO NM, HAMAGUCHI M, TOYODA T, NAGAI Y. Structural features unique to each of the three antigenic sites on the haemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus. *Virology* 1988;163:174-183.
65. GOULD AR, KATTENBELT JA, SELLECK P, HANSSON E, DELLA PA, WESTBURY HA. Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Res.* 2001;77:51-60.
66. GRAUSGRUBER W. Newcastle Krankheit bei Papageien. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 1972;59:353-356.
67. GRAVEL KA, MORRISON TG. Interacting domains of the HN and F proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 2003;77:11040-11049.
68. GRUND CH, MARSHALL M, GOLTZ M. Untersuchungen zur Sequenz des Fusionsprotein-Gens eines Aviären Paramyxovirus-Stammes, isoliert von an der Neuropathischen Magendilatation erkrankten Papageien. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg 2.-5. März 1998,187.
69. GRUND CH, WERNER O, GELDERBLOM HR, GRIMM F, KÖSTERS J. Avian Paramyxovirus serotype 1 isolates from the spinal cord of parrots display a very low virulence. *J. Vet. Med. B* 2002;49:445-451.
70. GRUND CH. Bedeutung von schwach virulenten Aviären Paramyxoviren bei Psittaziden. *Vet. Habil München* 2004.
71. HAMAGUCHI M, YOSHIDA T, NISHIKAWA K, NARUSE H, NAGAI Y. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology* 1983;128:105-117.
72. HAMAGUCHI M, NISHIKAWA K, TOYODA T, YOSHIDA T, HANAICHI RP, NAGAI Y. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. II. Structural and

- functional assembly associated with the cytoskeletal framework. *Virology* 1985;147:295-308.
73. HANSON RP, BRANDLY CA. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science* 1955;122:156-157.
74. HANSON RP, SPALATIN J, JACOBSON GS. The viscerotropic pathotype of Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1973;17:354-361.
75. HANSON RP, SPALATIN J. Thermostability of the haemagglutinin of Newcastle disease virus as a strain marker in epizootologic studies. *Avian Diseases* 1978;22:659-665.
76. HECKERT RA, COLLINS MS, MANVELL RJ, STRONG I, PEARSON JE, ALEXANDER DJ. Comparison of Newcastle disease virus isolated from cormorants isolated in Canada and the USA in 1975, 1990 and 1992. *Can. J. Vet. Res.* 1996;60:50-54.
77. HELDSTAB A, MORGENSTERN R, RUEDI D, ALBEK A, ALBEK M. Pathology of endemic infiltrative splanchnic neuritis in the gastrointestinal region of macaws (wasting macaw syndrome). *Verhandlungsbericht Int. Symp. Erkrankg. Zoot.* 1985:5.
78. HERCZEG J, WEHMANN E, BRAGG RR, TRAVASSOS DIAS PM, HADJIEV G, WERNER O, LOMNICZI B. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached southern Europe. *Arch. Virol.* 1999;144:2087-2099.
79. HERCZEG J, PASCUCCI S, MASSI P, LUINI M, SELLI L, CAPUA I, LOMNICZI B. A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Pathol.* 2001;30:163-168.
80. HERNANDEZ LD, HOFFMAN LR, WOLFSBERG TG, WHITE JM. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996;12:627-661.
81. HIGGINS DG, SHARP PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* 1989;5:151-153.



82. HITCHNER SB, JOHNSON EP. A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease (avian pneumoencephalitis). *Vet. Med.* 1948;43:525-530.
83. HITCHNER SB. Discovery of the B-1 strain of Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1975;19:215-223.
84. VAN DER HOEK L, BOOM R, GOUDSMIT J, SNIJDERS F, SOL CJA. Isolation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA from faeces by a simple method and difference between HIV-1 subpopulations in faeces and serum. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:581-588.
85. HOUVILAINEN A, EK-KOMMONEN C, MANVELL R, KINNUNEN L. Phylogenetic analysis of avian paramyxovirus 1 strains isolated in Finland. *Arch. Virol.* 2001;146:1775-1785.
86. HUANG Z, KRISHNAMURTHY S, PANDA A, SAMAL SK. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J. Virol.* 2003;77:8676-8685.
87. HUANG Z, PANDA A, ELANKUMARAN S, GOVINDARAJAN D, ROCKEMANN DD, SAMAL SK. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J. Virol.* 2004;78:4176-4184.
88. HUGHES PE. The pathology of myenteric ganglioneuritis; psittacine encephalomyelitis; proventricular dilatation of psittacines and macaw wasting syndrome. *Proc. 33rd Western Poult. Dis. Conf.* 1984:85-87.
89. IORIO RM, BORGMAN JB, GLICKMAN RL, BRATT MA. Genetic variation within a neutralizing domain of the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 1986;67:1393-1403.
90. IORIO RM, GLICKMAN RL, RIEL AM, SHEEHAN JP, BRATT MA. Functional and neutralization profile of seven overlapping antigenic sites on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus: monoclonal antibodies to some sites prevent viral attachment. *Virus Research* 1989a;13:245-262.

91. IORIO RM, SYDDALL RJ, GLICKMAN RL, RIEL AM, SHEEHAN JP, BRATT MA. Identification of amino acid residues important to the neuraminidase activity of the HN glycoprotein of Newcastle disease virus. *Virology* 1989b;173:196-204.
92. IORIO RM, SYDDALL RJ, SHEEHAN JP, BRATT MA, GLICKMAN RL, RIEL AM. Neutralization map of the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus: domains recognized by monoclonal antibodies that prevent receptor recognition. *J. Virol.* 1991;65:4999-5006.
93. IORIO RM, GLICKMAN RL, SHEEHAN JP. Inhibition of fusion by neutralizing monoclonal antibodies to the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 1992;73:1167-1176.
94. IORIO RM, FIELD GM, SAUVRON JM, MIRZA AM, DENG R, MAHON PJ, LANGEDIJK JP. Structural and functional relationship between the receptor recognition and neuraminidase activities of the Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase protein: Receptor recognition is dependent on neuraminidase activity. *J. Virol.* 2001;75:1918-1927.
95. ISHADA N, TAIRO H, OMATA T, MIZUMOTO K, HATTORI S, IWASAKI K, KAWAKITA M. Sequence of 2.617 nucleotides from the 3' end of Newcastle disease virus genome RNA and predicted amino acid sequence of viral NP protein. *Nucleic Acids Research* 1986;14:6551-6564.
96. ISHIDA M, NEROME K, MATSUMOTO M, MIKAMI T, OYA A. Characterization of reference strains of Newcastle disease virus (NDV) and NDV-like isolates by monoclonal antibodies to HN subunits. *Arch. Virol.* 1985;85:109-121.
97. IORIO RM, BRATT MA. Monoclonal antibodies to Newcastle disease virus: delineation of four epitopes on the HN glycoprotein. *J. Virol.* 1983;48:440-450.
98. IYER SG. Paralysis in a pigeon due to Doyle's (Ranikhet) disease virus. *Indian J. Vet. Sci. Anim. Husbandry* 1939;9:379-382.
99. JARECKI BLACK JC, KING DJ. An oligonucleotide probe that distinguishes isolates of low virulence from the more pathogenic strains of Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1993;37:724-730.

100. JESTIN V, CHERBONNEL M, MORIN M, GUITTET M, BENNEJEAN G. Characterization of French avian paramyxovirus type 1 (PMV 1) isolates with a panel of monoclonal antibodies to the Ploufragan strain of Newcastle disease virus. *Arch. Virol.* 1989a;105:189-198.
101. JESTIN V, JESTIN A. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). *Arch. Virol.* 1991;118:151-161.
102. JOSHI SB, DUTCH RE, LAMB RA. A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: Parallels to influenza virus haemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* 1998;248:20-34.
103. KALETA EF, ALEXANDER DJ, RUSSELL PH. The first isolation of the PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons. *Avian Pathol.* 1985;14:553-557.
104. KALETA EF, BALDAUF C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: *Newcastle Disease*. Ed.: Alexander DJ. 1. ed. Boston: Kluwer Academic Publications 1988:197-246.
105. KALETA EF, KRAUTWALD-JUNGHANNS M-E. *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*. 1 ed. Hannover: Schlütersche 1999.
106. KANT A, KOCH G, VAN ROOZELAAR F, BALK F, HUURNE AT. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Diseases* 1997;26:837-840.
107. KAPLAN AH, ZACK JA, KNIGGE M, PAUL DA, KEMPF DJ, NORBECK DW, SWANSTROM R. Partial inhibition of human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. *J. Virol.* 1993;67:4050-4055.
108. KASCHULA VR. The domestic pigeon as possible carrier of Newcastle disease. *Ondersteport J. Vet. Res.* 1952;25:25-27.

109. KE GM, LIU HJ, LIN MY, CHEN JH, TSAI SS, CHANG PC. Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. *J. Virol. Meth.* 2001;97:1-11.
110. KHO CL, MOHD AZMI ML, ARSHAD SS, YUSOFF K. Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. *J. Virol. Meth.* 2000;86:71-83.
111. KHO CL, TAN WS, TEY BT, YUSOFF K. Newcastle disease virus nucleocapsid protein: self-assembly and length-determination domains. *J. Gen. Virol.* 2003;84:2163-2168.
112. KHO CL, TAN WS, TEY BT, YUSOFF K. Regions on nucleocapsid protein of Newcastle disease virus that interact with its phosphoprotein. *Arch. Virol.* 2004;149:997-1005.
113. KING DJ, SEAL BS. Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus (NDV) field isolates with comparisons to reference NDV strains. *Avian Diseases* 1998;42:507-516.
114. KOLAKOFSKY D, PELET T, GARCIN D, HAUSMANN S, CURRAN J, ROUX L. Genome length: the rule of six revisited. *Virology* 1998;72:891-899.
115. KOMMERS GD, KING DJ, SEAL BS, BROWN CC. Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. *Avian Diseases* 2001;45:906-921.
116. KORBEL R, KÖNIG HE. Applikations- und Blutentnahmetechniken. In: *Anatomie und Propädeutik des Geflügels*. Eds.: König HE, Liebich HG, 1 ed. Stuttgart, New York: Schattauer 2001:265-280.
117. KRANEVELD FC. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned. Indisch Diergeneesk* 1926;28:448-450.
118. KRISHNAMURTHY S, SAMAL SK. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *J. Gen. Virol.* 1998;79:2419-2424.

119. KUIKEN T, LEIGHTON FA, WOBESER G, DANESIK KL, RIVA J, HECKERT RA. An epidemic of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.* 1998;34:457-471.
120. KURILLA MG, STONE HO, KEENE JD. RNA sequence and transcriptional properties of the 3' end of the Newcastle disease virus genome. *Virology* 1985;145:203-212.
121. LAMB RA, KOLAKOFSKY D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: *Fields virology*. Eds.: Knipe, DM, Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins 2001:1305-1340.
122. LAMONTAGNE JR, SCHILLER JG, THACORE HR, FEINGOLD DS, YOUNGNER JS. Infective and non-infective haemagglutinating particles of Newcastle disease virus: Biological and Chemical Characterization. *J. Virol.* 1975;16:1191-1199.
123. LANA DP, SNYDER DB, KING DJ, MARQUARDT WW. Characterization of a battery of monoclonal antibodies for differentiation of Newcastle Disease Virus and Pigeon Paramyxovirus-1 strains. *Avian Diseases* 1988;32:273-281.
124. LANGEDIJK JPM, DAUS FJ, OIRSCHOT JT. Sequence and structure alignment of *paramyxoviridae* attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus haemagglutinin. *J. Virol.* 1997;71:6155-6167.
125. LIANG R, CAO DJ, LI JQ, CHEN J, GUO X, ZHUANG FF, DUAN MX. Newcastle disease outbreaks in western China were caused by the genotypes VIIa and VIII. *Vet. Microbiol.* 2002;87:193-203.
126. LI YP, ZHANG MF. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus from allantoic fluid and organs of experimentally infected chickens using two novel probes. *Arch. Virol.* 2004;149:1231-1243.
127. LIN MY, LIU HJ, KE GM. Genetic and antigenetic analysis of Newcastle disease viruses from recent outbreaks in Taiwan. *Avian Pathol.* 2003;32:345-350.
128. LOCKE DP, SELLERS HS, CRAWFORD JM, SCHULTZ-CHERRY A, KING DJ, MEINERSMANN RJ, SEAL BS. Newcastle disease virus phosphoprotein gene

- analysis and transcriptional editing in avian cell. *Virus Res.* 2000;69:55-68.
129. LOMNICZI B, WEHMANN E, HERCZEG J, BALLAGI-PORDÁNY A, KALETA EF, WERNER O, MEULEMANS G, JORGENSEN PH, MANTÉ AP, GIELKENS ALJ. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch. Virol.* 1998;143:49-64.
130. LONG L, BRASSEUR R, WEMERS C, MEULEMANS G, BURNY A. Fusion (F) protein gene of Newcastle disease virus: sequence and hydrophobicity. Comparative analysis between virulent and avirulent strains. *Virus Genes* 1988;1:333-350.
131. LÜTHGEN W, WACHENDÖRFER G. Newcastle disease bei frisch importierten Großpapageien. *Deutsche Tierärztl. Wochenschr.* 1970;77:407-408.
132. LÜTHGEN W. Spontane Newcastle disease bei Zoo- und Ziervögeln. *Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zootiere Kolmården, XV* 1973:255-265.
133. LÜTHGEN W. Die Newcastle Krankheit (Newcastle-Disease) bei Papageien und Sittichen. *Advanc. Vet. Med.* 1981;Suppl. 31.
134. MASE M, IMAI K, SANADA Y, SANADA N, YUASA N, IMADA T, TSUKAMOTO K, YAMAGUCHI S. Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:3826-3830.
135. MAYO MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 2002;147:1655-1656.
136. MCCOLLUM WH, BRANDLY CH. Haemolytic activity of Newcastle disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 1955;16:584-592.
137. MCGINNES LW, MCQUAIN C, MORRISON T. The P protein and the nonstructural 38K and 29K proteins of Newcastle disease virus are derived from the same open reading frame. *Virology* 1988;164:256-264.
138. MCGINNES LW, MORRISON TG. The role of individual cysteine residues in the formation of the mature, antigenic HN protein of Newcastle disease virus. *Virology* 1994a;200:470-483.

139. MCGINNES LW, MORRISON TG. Conformationally sensitive antigenic determinants on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus form with different kinetics. *Virology* 1994b;199:255-264.
140. MCGINNES LW, MORRISON TG. The role of individual oligosaccharide chains in the activities of the HN glycoprotein of Newcastle disease virus. *Virology* 1995;212:398-410.
141. MCGINNES LW, GRAVEL K, MORRISON TG. NDV HN protein alters the conformation of F protein in plasma membranes. 21st Annual Meeting American society for virology; Lexington, KN 2002;149.
142. MCNULTY MS, ADAIR BM, O'LOAN CJ, ALLAN GM. Isolation of an antigenically unusual paramyxovirus type 1 from chickens. *Avian Pathol.* 1988;17:509-513.
143. MEBATSION T, VERSTEGEN S, DEVANN LTC, RÖMER-OBERDÖRFER A, SCHRIER CC. A recombinant Newcastle disease virus with low-level V Protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J. Virol.* 2001;75:420-428.
144. MEBATSION T, de VAAN LTC, de HAAS N, RÖMER-OBERDÖRFER A, BRABER M. Identification of a mutation in editing of defective Newcastle disease virus recombinants that modulates P-gene mRNA editing and restores virus replication and pathogenicity in chicken embryos. *J. Virol.* 2003;77:9259-9265.
145. MEULEMANS G, GONZE M, CARLIER MC, PETIT P, BURNY A, LONG L. Evaluation of the use of monoclonal antibodies to haemagglutinin and fusion glycoproteins of Newcastle disease virus for virus identification and strain differentiation purposes. *Arch. Virol.* 1987;92:55-62.
146. MILLAR NS, CHAMBERS P, EMMERSON PT. Nucleotide sequence analysis of the haemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 1986;67:1917-1927.
147. MILLAR NS, CHAMBERS P, EMMERSON PT. Nucleotide sequence of the fusion and haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, strain Ulster: Molecular basis for variations in pathogenicity between strains. *J. Gen. Virol.* 1988;69:613-620.

148. MIRZA AM, SHEEHAN JP, HARDY LW, GLICKMAN RL, IORIO RM. Structure and function of a membrane anchor-less form of the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Biol. Chem.* 1993;268:21425-21431.
149. MONTEIRO L, BONNEMAISON D, VEKRIS A, PETRY KG, BONNET J, VIDAL R, CABRITA J, MEGRAUD F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in faeces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:995–998.
150. MORRISON T, PORTNER A. Structure, function and intracellular processing of the glycoproteins of *Paramyxoviridae*. In: *Paramyxoviruses*. Ed.: Kingsbury DW. New York: Plenum Press; 1991:347-382.
151. MORRISON TG. The three faces of paramyxovirus attachment proteins. *Trends in Microbiol.* 2002;9:103-105.
152. MORRISON TG. Structure und function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochem. Biophys. Acta* 2003;1614:73-84.
153. NAGAI Y, KLENK HD, ROTT R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 1976;72:494-508.
154. NAGAI Y, KLENK HD. Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage. *Virology* 1977;77:125-134.
155. NANTHAKUMAR T, KATARIA RS, TIWARI AK, BUTCHAI AH G, KATARIA JM. Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet. Res. Commun.* 2000;24:275-286.
156. NISHIKAWA K, HANADA N, MORISHIMA T, YOSHIDA T, HAMAGUCHI M, TOYODA T, NAGAI Y. Antigenic characterization of the internal proteins of Newcastle disease virus by monoclonal antibodies. *Virus Res.* 1987;7:83-92.
157. OBERDÖRFER A, WERNER O. Newcastle disease virus: detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. *Avian Pathol.* 1998;27:237-243.



158. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Newcastle Disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4. Ed. Paris 2001.
159. OGASAWARA T, GOTOH B, SUZUKI H, ASAKA J, SHIMOKATA K, ROTT R, NAGAI Y. Expression of Factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *EMBO* 1992;11:467-472.
160. PANIGRAHY B, SENNE DA, PEARSON JE, MIXSON MA, CASSIDY DR. Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. *Avian Diseases* 1993;37:254-258.
161. PANSIN A, SHIHMANTER E, WEISMAN Y, ÖRVELL C, LIPKIND M. Antigenetic heterogeneity among the field isolates of Newcastle disease virus (NDV) in relation to the vaccine strain. I. Studies on viruses isolated from wild birds in Israel. *Comp. Immunol., Microbiol. & Infect. Dis.* 2002;25:95-108.
162. PANSIN A, SHIHMANTER E, WEISMAN Y, ÖRVELL C, LIPKIND M. Antigenetic heterogeneity among the field isolates of Newcastle disease virus (NDV) in relation to the vaccine strain. Part II. Studies on viruses isolated from domestic birds in Israel. *Comp. Immunol., Microbiol. & Infect. Dis.* 2002;25:173-185.
163. PEARSON JE, SENNE D, ALEXANDER DJ, TAYLOR WD, PETERSON LA, RUSSELL PH. Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. *Avian Diseases* 1987;31:105-111.
164. PEETERS BPH, DE LEEUW OD, KOCH G, GIELKENS ALJ. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 1999;73:5001-5009.
165. PEISAJOVICH SG, SAMUEL O, SHAI Y. Paramyxovirus F1 protein has two fusion peptides: implications for the mechanism of membrane fusion. *J. Mol. Biol.* 2000;296:1353-1365.
166. PHILLIPS RJ, SAMSON ACR, EMMERSON PT. Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the "rule of six". *Arch. Virol.* 1998;143:1993-2002.

167. PITT JJ, DA SILVA E, GORMAN J. Determination of the disulfide bond arrangement of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. Correlation with a beta-sheet propeller structural fold predicted for paramyxoviridae attachment proteins. *J. Biol. Chem.* 2000;275:6469-6478.
168. POHL R. Untersuchungen über die Pathogenität eines aus Papageien isolierten Newcastle disease Virus. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 1971;84:191-193.
169. REEVE P, POSTE G. Studies on the cytopathogenicity of Newcastle disease virus: Relationship between virulence, polykaryocytosis and plaques size. *J. Gen. Virol.* 1971;11:17-24.
170. REUSS U. *Münchner Tierheilkunde* 1961;13:153-161.
171. RÖMER-OBERDÖRFER A, MUNDT E, MEBATSION T, BUCHHOLZ UJ, METTENLEITNER TC. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J. Gen. Virol.* 1999;80:2987-2995.
172. RÖMER-OBERDÖRFER A, WERNER O, VEITS J, MEBATSION T, METTENLEITER TC. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 2003;84:3121-3129.
173. ROTT R, REDA IM, SCHÄFER W. Isolation and characterization of haemagglutinating non-infectious particles produced during multiplication of Newcastle disease virus (NDV). *Virology* 1962;16:207-209.
174. ROTT R, REDA IM, SCHÄFER W. Charakterisierung der verschiedenen, nach Infektion mit Newcastle Disease Virus auftretenden, nichtinfektiösen-hämagglutinierenden Teilchen. *Z. Naturforschg.* 1963;18:188-194.
175. ROTT R. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses: Brief review. *Arch. Virol.* 1979;59:285-298.
176. ROTT R. In vitro Differenzierung von pathogenen und apathogen Aviären Influenzaviren. *Berliner und Münchner Tierärztl. Wochenschr.* 1985;98:37-39.

177. RUSSELL PH, ALEXANDER DJ. Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 1983;75:243-253.
178. SAKAGUCHI T, TOYODA T, GOTOH B, INOCENCIO NM, KUMA K, MIYATA T, NAGAI Y. Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the haemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* 1989;169:260-272.
179. SALLERMANN, U. Untersuchungen über die Newcastle-Krankheit beim Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*) und die Möglichkeit einer Immunprophylaxe. *Vet. Diss., Gießen* 1973.
180. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning. A laboratory manual. Eds.: Ford N, Nolan C, Ferguson M. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
181. SAMSON ACR, LEVESLEY I, RUSSEL PH. The 36K polypeptide synthesized in Newcastle disease virus-infected cells possesses properties predicted for the hypothesized 'V' protein. *J. Gen. Virol.* 1991;72:1709-1713.
182. SAMUEL O, SHAI Y. Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry*;40:1340-1349.
183. SCHEID A, CHOPPIN RW. Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 1973;11:263-271.
184. SCHEID A. Paramyxoviridae In: *Animal virus structure*. Ed.: Nermut S. New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier Science 1987;16:233-252.
185. SCHLOER G, HANSON RP. Relationship of plaque size and virulence for chicken of 14 representative Newcastle Disease virus strains. *J. Virol.* 1968;2:40-47.
186. SCHLOER G. Antigenic relationships among Newcastle disease virus mutants obtained from laboratory strains and from recent California isolates. *Infect. Immun.* 1974;10:724-732.

187. SCHMELLEKAMP A. Untersuchungen zur Wirksamkeit einer homologen Ölemulsionsvakzine gegen die Paramyxovirose der Tauben basierend auf einem schwach virulenten Tauben-Stamm (P201). Vet. Diss. München, in Vorbereitung.
188. SCHNITZER TJ, LODISH HF. Non-infectious vesicular stomatitis virus particles deficient in the viral nucleocapsid. J. Virol. 1979;29:443–447.
189. SCHOOP G, SIEGERT R, GALASSI D, KLÖPPEL G. Newcastle-Infektionen beim Steinkauz (*Athene noctua*), Hornraben (*Bucorvus* sp.), Seeadler (*Haliaeetus albicilla*) und Riesenvogel (*Dacelo gigas*). Münchner Tierheilkunde 1955;7:223-235.
190. SCHUY W, GARTEN W, LINDER D, KLENK HD. The carboxyterminus of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus is exposed at the surface of the viral envelope. Virus Res. 1984;1:415-426.
191. SEAL BS, KING DJ, BENNETT JD. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcriptase PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiology analysis. J. Clin. Microbiol. 1995;33:2624-2630.
192. SEAL BS. Analysis of matrix protein gene nucleotide sequence diversity among Newcastle disease virus isolates demonstrates that recent disease outbreaks are caused by viruses of psittacine origin. Virus Genes 1996a;11:217-224.
193. SEAL BS, KING DJ, BENNETT JD. Characterization of Newcastle disease virus vaccines by biological properties and sequence analysis of haemagglutinin-neuraminidase protein gene. Vaccine 1996b;14:761-766.
194. SEAL BS, KING DJ, LOCKE DP, SENNE DA, JACKWOOD MW. Phylogenetic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. J. Clin. Microbiol. 1998;36:1141-1145.
195. SEAL BS, KING DJ, MEINERSMANN RJ. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among paramyxoviridae. Virus Res. 2000a;66:1-11.

196. SEAL BS, CRAWFORD JM, SELLERS HS, LOCKE DP, KING DJ. Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res.* 2002;83:119-29.
197. SEAL BS. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Funct. Integr. Genomics* 2004; 4:246-257.
198. SENNE DA, PEARSON JE, MILLER LD, GUSTAFSON GA. Virus isolation from pet birds submitted for importation into the United States. *Avian Diseases* 1983;27:731-744.
199. SERGEL T, MCGINNES LW, PEEPLES ME, MORRISON TG. The attachment function of the Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation. *Virology* 1993;193:717-726.
200. SHEEHAN JP, IORIO RM, SYDDALL RJ, GLICKMAN RL, BRATT MA. Reducing agent-sensitive dimerization of the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus correlates with the presence of cysteine at residue 123. *Virology* 1987;161:603-606.
201. SHENGQING Y, KISHIDA N, ITO H, KIDA H, OTSUKI K, KAWAOKA Y, ITO T. Generation of velogenic Newcastle disease virus from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology* 2002;301:206-211.
202. SPALATIN J, HANSON RP, BEARD PD. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1970;14:542-549.
203. SRINIVASAPPA GB, SNYDER DB, MARQUARDT WW, KING DJ. Isolation of a monoclonal antibody with specificity for commonly employed vaccine strains of Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1986;30:562-7.

- 
204. STÄUBER N, BRECHTBÜHL K, BRUCKNER L, HOFMANN MA. Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. *Vaccine* 1995;13:360-364.
205. STEWARD M, VIPOND IB, MILLAR NS, EMMERSON PT. RNA Editing in Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 1993;74:2539-2547.
206. STONE-HULSANDER J, MORRISON TG. Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. *J. Virol.* 1997;71:6287-6295.
207. STONE-HULSANDER J, MORRISON TG. Mutational analysis of heptad repeats in the membrane-proximal region of Newcastle disease virus HN protein. *J. Virol.* 1999;73:3630-3637.
208. TANABAYASHI K, COMPANS RW. Functional interaction of paramyxovirus glycoproteins: identification of a domain in HN that promotes cell fusion. *J. Virol.* 1996;70:6112-6118.
209. THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673-4680.
210. TOYODA T, SAKAGUCHI T, IMAI K, INOCENCIO NM, GOTOH B, HAMAGUCHI M, NAGAI Y. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* 1987;158:242-247.
211. TOYODA T, SAKAGUCHI T, HIROTA H, GOTOH B, KUMA K, MIYATA T, NAGAI Y. Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* 1989;169:273-282.
212. WACHENDÖRFER G, LÜTHGEN W. Untersuchungen über die Pathogenität eines aus Papageien isolierten Newcastle disease Virus. *Prakt. Tierarzt* 1971;52:612-614.

213. WALKER JW, HERON BR, MIXSON MA. Exotic Newcastle disease eradication program in the United States. *Avian Diseases* 1973;17:486-503.
214. WATERSON AP, PENNINGTON TH, ALLAN WH. Virulence in Newcastle disease virus. *Brit. Med. Bull.* 1967;23:138-143.
215. WEHMANN E, HERCZEG J, BALLAGI-PORDÁNY A, LOMNICZI B. Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains LaSota and B1 by restriction site analysis of their matrix gene. *Vaccine* 1997;15:1430-1433.
216. WEHMANN E, HERCZEG J, TANYI J, NAGY E, LOMNICZI B. Lentogenic field isolates of Newcastle disease virus isolated in Canada and Hungary are identical with vaccine type used in the region. *Avian Pathol.* 1999;28:6-12.
217. WEHMANN E, CZEGLÉDI A, WERNER O, KALETA EF, LOMNICZI B. Occurrence of genotypes IV, V, VI and VIIa in Newcastle disease outbreaks in Germany between 1939 and 1995. *Avian Pathol.* 2003;32:157-163.
218. WEMERS CD, DE HENAU S, NEYT C, ESPION D, LETELLIER C, MEULEMANS G, BURNY A. The hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of Newcastle disease virus strain Italien (ndv Italien): comparison with HNs of other strains and expression by a vaccinia recombinant. *Arch. Virol.* 1987;97:101-113.
219. WERNER O. Newcastle Disease - Aktuelle Seuchensituation in Deutschland aus der Sicht des Nationalen Referenzlabors. *Fachgruppe Geflügelkrankheiten der DVG* 1995;48. Fachgespräch, Hannover:87-105.
220. WERNER O, OBERDÖRFER A, KÖLLNER B, MANVELL RJ, ALEXANDER DJ. Characterisation of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992-96. *Avian Pathol.* 1999;28:79-88.
221. WESTBURY HA. Newcastle disease virus: an evolving pathogen. *Avian Pathol.* 2001;30:5-11.
222. WILDE J, EIDEN J, YOLKEN R. Removal of inhibitory substances from human faecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1990;28:1300-1307.

223. WINTEROLL G, GRIMM F. Untersuchungen zur Impfprophylaxe bei Psittaziden und Exoten gegen die Newcastle disease. *Der praktische Tierarzt* 1974;10:572-576.
224. WISE MG, SUAREZ DL, SEAL BS, PEDERSEN JC, SENNE DA, KING DJ, KAPCZYNSKI DR, SPACKMAN E. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:329-338.
225. WOERPEL RW, ROSSKOPF WJ. Clinical and pathological features of macaw wasting disease (proventricular dilatation syndrome). *Proc. 33rd Western Poultry Dis. Conf.* 1984;89-90.
226. YANG CY, SHIEH HK, LIN YL, CHANG PC. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe. *Avian Diseases* 1999;43:125-130.
227. YOUNG JK, LI D, ABRAMOWITZ MC, MORRISON TG. Interaction of Peptides with Sequences from the Newcastle Disease Virus Fusion Protein Heptad Repeat Regions. *J. Virol.* 1999;73:5945-5956.
228. YU L, WANG Z, JIANG Y, CHANG L, KWANG J. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:3512-3519.
229. YUSOFF K, MILLAR NS, CHAMBERS P, EMMERSON PT. Nucleotide sequence analysis of the L gene of Newcastle disease virus: homologies with Sendai and vesicular stomatitis viruses. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:3961-3976.
230. YUSOFF K, TAN WS. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathol.* 2001;30:439-455.
231. ZAITSEV V, VON ITZSTEIN M, GROVES D, KIEFEL M, TAKIMOTO T, PORTNER A, TAYLOR G. Second sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: Implications for fusion. *J. Virol.* 2004;78:3733-3741.



## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Korbel für die Annahme der Arbeit und Überlassung des Arbeitsplatzes sowie die erfahrene Förderung.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. C. Grund möchte ich mich für die Überlassung des Themas und besonders für die fachlich wie menschlich ausgezeichnete Unterstützung bei der Betreuung der Arbeit bedanken.

Den technischen Angestellten Dana Härtner und Kathrin Schmidbauer sowie allen Doktorandinnen der virologischen Abteilung des Instituts für Geflügelkrankheiten der LMU München danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Gelderblom und Frau F. Kaulbars bin ich für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Ultradünnschnitt zu besonderem Dank verpflichtet. Für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Negativkontrast bedanke ich mich herzlich bei Herrn Akad. Dir. Dr. W. Eichhorn und Frau A. Jahnke.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. C.-P. Czerny bedanke ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Herrn Dr. S. Schoch und Herrn Dr. W. von Bomhard danke ich für die redaktionelle Überarbeitung beziehungsweise für die Hilfe bei der Erstellung der Summary sowie beiden für ihre Freundschaft.

Meiner Frau Cosima Mohn möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen für ihre Liebe sowie für die Unterstützung und Geduld, die sie während dieser Arbeit aufbrachte.

Meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, kann ich nicht genug danken für das Ermöglichen eines sorgenfreien Lebensweges und den dauerhaften Rückhalt in allen Lebenslagen.

## Lebenslauf

<b>Name</b>	Ulrich Mohn
<b>Geburtsdatum</b>	31. Juli 1972
<b>Geburtsort</b>	Stuttgart
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Eltern</b>	Paul Mohn, Bankkaufmann, Dipl.-Volkswirt Heidi Mohn, geb. Preiß, Hausfrau
<b>Familienstand</b>	verheiratet
<b>Ehefrau</b>	Cosima Mohn, geb. Schoch, Sonderschullehrerin
<b>Schulbildung</b>	1979 bis 1983: Grundschule, Stuttgart-Degerloch 1983 bis 1992: Wilhelms-Gymnasium, Stuttgart-Degerloch
<b>Hochschulbildung</b>	1995 bis 2001: Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
<b>Approbation</b>	Mai 2001
<b>Dissertation</b>	Juli 2001 bis Dez. 2004: Klinik für Vögel der LMU München, Vorstand: Prof. Dr. R. T. Korbel
<b>Derzeitige Tätigkeit</b>	Wiss. Mitarbeiter in der Abteilung Tierhygiene und Mikrobiologie, Tierärztliches Institut der Agrarwissenschaftlichen Fakultät, Georg-August-Universität Göttingen, Leitung: Prof. Dr. Dr. C.-P. Czerny