

**ANTIGENE DIVERSITÄT (SEROTYPISIERUNG)
UND DNA-HETEROGENITÄT VON
HERPESVIRUSISOLATEN AUS VÖGELN
DER ORDNUNG PSITTACIFORMES**

SIMONE-ALICE MAYER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

**Antigene Diversität (Serotypisierung) und DNA-
Heterogenität von Herpesvirusisolaten aus Vögeln
der Ordnung Psittaciformes**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Simone-Alice Mayer

Tierärztin aus Krastel

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. F. Kaleta

2. Berichterstatter: PD Dr. P. Becher

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2006

Abkürzungen

a	: Jahre
<i>A.</i>	: <i>Amazona</i>
Aqua dest.	: Aqua destillata
ATCC	: American Type Culture Collection
BGM	: Buffalo Green Monkey
BME	: Basal Medium Eagle's
BU	: Bakteriologische Untersuchung
bzw.	: beziehungsweise
° C	: Grad Celsius
ca.	: circa
cm ³	: Kubikzentimeter
cpE	: zytopathischer Effekt
d.	: der/des
Da	: Darm
d.h.	: das heißt
Dm	: Drüsenmagen
DNA	: desoxyribonucleic acid
DPB	: Dulbecco's Phosphate Buffer
ed./eds.	: editor/editors
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	: et altera
etc.	: et cetera
Fa.	: Firma
FKS	: Fœtales Kälberserum
g	: Gramm
GKID ₅₀	: Gewebekultur infektiöse Dosis
h	: hora; Stunde
HA	: Hämagglutination
He	: Herz
HEF	: Hühnerembryofibroblasten-Kulturen
Hi	: Gehirn

HSV 1	: Herpes-Simplex-Virus Typ 1
HV	: Herpesvirus
ICTV	: international comitee for the taxonomy of viruses
i.d.R.	: in der Regel
ILT	: infektiöse Laryngotracheitis
IPP	: internal papillomatosis of parrots
IUDR	: 5-Iodo-2-Desoxy-Uridin
kb	: Kilobasen
kbp	: Kilobasenpaare
KID	: kulturinfektiöse Dosis
l	: Liter
Le	: Leber
log ₁₀	: Logarithmus zur Basis 10
Ls	: Luftsack
Lu	: Lunge
M	: Mol
mA	: Milliampère
mg	: Milligramm
Mi	: Milz
min	: Minuten
ml	: Milliliter
mm	: Millimeter
mM	: Millimol
mRNA	: messenger RNA
Myk.	: Mykologische Untersuchung
Ni	: Niere
nm	: Nanometer
Nr.	: Nummer
o.g.	: oben genannt
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PEG	: Polyethylenglykol
Pers. Mit.	: persönliche Mitteilung
p.i.	: post infectionem
PK	: Prozentuale Neutralisationskapazität

pp.	: pages; Seiten
PPD	: Pacheco's Parrot Disease
PsHV	: Psittaziden-Herpesvirus
PU	: Parasitologische Untersuchung
p. vacc.	: post vaccinationem
RNA	: Ribonukleinsäure
S	: Seite
sec.	: Sekunde
s.o.	: siehe oben
Sp.	: Spezies
SPF	: spezifiziert pathogen frei
TV	: Trypsin-Versen
u.	: und
U / min	: Umdrehung / Minute
U _s	: short unit
U _L	: long unit
usw.	: und so weiter
UV	: Ultraviolett
Viro.	: Virologische Untersuchung
V	: Volt
v.a.	: vor allem
Vet med. Diss.	: veterinärmedizinische Dissertation
Vol.	: Volume; Band
Wo	: Wochen
z.B.	: zum Beispiel
zit.	: zitiert
z.T.	: zum Teil

1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Literaturübersicht	4
2.1 Die Pacheco'sche Papageienkrankheit (PPD)	4
2.1.1 Einleitung	4
2.1.2 Geschichtlicher Überblick zur PPD	5
2.1.3 Klinisches Bild (Symptomatik)	7
2.1.4 Pathologie der PPD	9
2.1.4.1 Pathologisch-anatomische Veränderungen	9
2.1.4.2 Pathologisch-histologische Veränderungen	10
2.1.5 Epidemiologie	11
2.1.6 Pathogenese	13
2.1.7 Diagnose	14
2.1.8 Therapie	16
2.1.9 Prophylaxe	18
2.2 Erregereigenschaften	20
2.2.1 Allgemeines	20
2.2.2 Einteilung und charakteristische Vertreter	22
2.2.3 Morphologie	23
2.2.4 Genom und Genomaufbau	24
2.2.5 Virusreplikation	27
2.2.5.1 Lytischer Infektionszyklus	27
2.2.5.2 Latenter Infektionszyklus	29
2.3 Besonderheiten des PsHV	30
2.3.1 Chemische und biologische Eigenschaften	30
2.3.2 Serologische Eigenschaften	30

3 Material und Methoden	32
3.1 Material	32
3.1.1 Virusisolate	32
3.1.1.1 Neue Virusisolate	32
3.1.1.2 Sonstige untersuchte Virusisolate	36
3.1.1.3 Als „Referenzstämme“ verwendete PsHV-Isolate	38
3.1.1.4 Negativkontrollen	39
3.1.2 SPF-Eier und daraus hergestellte Zellkulturen	40
3.1.2.1 SPF-Hühnereier	40
3.1.2.2 Primäre Hühnerembryofibroblasten-Kulturen (HEF)	42
3.1.3 Tiere	42
3.1.4 Antiseren und Antikörper	42
3.1.4.1 Hyperimmunseren aus Kaninchen	42
3.1.4.2 Goat-Anti-Rabbit Immunglobulin-(IgG)	43
3.1.5 Enzyme	43
3.1.5.1 Restriktionsendonukleasen	43
3.1.5.2 Polymerase	44
3.1.6 Synthetische Oligonukleotide (Primer)	44
3.1.7 Fertige Reagenziensysteme	46
3.1.8 Medien, Reagenzien und Pufferlösungen für die Zellkultur	47
3.1.9 Lösungen und Reagenzien für die Impfstoffherstellung zur Immunisierung der Kaninchen	51
3.1.10 Lösungen und Reagenzien für die DNA-Präparation	53
3.1.11 Restriktionsenzymanalyse und PCR	56
3.1.12 Elektrophorese	57
3.1.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	57
3.1.12.2 Agarose-Gelelektrophorese	61
3.1.13 Lösungen und Reagenzien für die Präparation der viralen Proteine und für die Western Blot-Analyse	62

3.2 Methoden	68
3.2.1 Primäre Hühnerembryofibroblasten-Kulturen (HEF)	68
3.2.1.1 Herstellung der HEF-Kulturen	68
3.2.1.2 Kultivierung und Subkultivierung	69
3.2.1.3 Virusisolierung, -identifizierung und -vermehrung	69
3.2.1.3.1 Virusisolierung	69
3.2.1.3.2 Identifizierung der Virusisolate	70
3.2.1.3.3 Virusvermehrung	70
3.2.1.4 Virustitrationen	71
3.2.1.5 Neutralisationstests	71
3.2.1.6 Berechnung des PK-Wertes	72
3.2.2 Herstellung von Hyperimmunseren in Kaninchen	73
3.2.2.1 Virusreinigung mit gleichzeitiger Antigenanreicherung	73
3.2.2.2 Immunisierung der Kaninchen	73
3.2.2.3 Blutentnahme	74
3.2.2.4 Serumgewinnung	74
3.2.3 Restriktionsenzymanalyse	75
3.2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion viraler DNA	76
3.2.3.2 Ethanolpräzipitation von DNA	76
3.2.3.3 Quantifizierung von DNA-haltigen Lösungen	76
3.2.3.4 Restriktionsspaltung von DNA	77
3.2.3.5 Agarosegelelektrophorese	78
3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	79
3.2.4.1 Prinzip der PCR	79
3.2.4.2 Anzucht der Virusisolate für die PCR	79
3.2.4.3 Präparation der viralen DNA	80
3.2.4.4 Vorbereitung der Oligonukleotidprimer	80
3.2.4.6 Zyklusbedingungen der PCR	82
3.2.5 SDS-Polyacrylamid- und Western Blot-Analyse	83
3.2.5.1 Extraktion viraler Proteine aus infizierten Zellkulturen	83
3.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	84
3.2.5.3 Western Blot	85
3.2.5.4 Immunoblotting	86

4 Ergebnisse	87
4.1 Identifizierung der Virusisolate	87
4.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung	87
4.1.2 Chloroformresistenztest	89
4.1.3 Kultivierung mit IUDR	89
4.1.4 Beobachtete zytopathische Veränderungen in HEF-Kulturen	91
4.1.4.1 Virusisolierung aus Organmaterial	91
4.1.4.2 Zeitliches Auftreten eines CPE	93
4.1.4.3 Aussehen des CPE in HEF-Kulturen	95
4.2 Serologische Untersuchungen	100
4.2.1 Herstellung von Hyperimmunseren in Kaninchen	100
4.2.1.1 Virusanreicherung und Reinigung mit Polyethylenglycol	100
4.2.1.2.1 Antikörperkinetik nach Immunisierung der Kaninchen	102
4.2.1.2.2 Neutralisationstests in HEF-Kulturen	103
4.2.1.2.3 PK-Werte	111
4.3 Restriktionsenzymanalyse	118
4.3.1 Ergebnisse der Vorversuche	118
4.3.2 Ergebnisse der Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen	122
4.4 Polymerasekettenreaktion	147
4.4.1 Amplifikation der Virusisolate mittels PsHV-PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2001)	147
4.5 Vergleich der Proteinmuster und Western Blot	163
4.5.1 Vergleich der Proteinmuster	163
4.5.2 Western Blot	164

5 Diskussion	167
5.1 Virusidentifikation	167
5.2 Neutralisationstests in HEF-Kulturen	171
5.3 Restriktionsenzymanalyse	172
5.4 Poymerase-Kettenreaktion	177
5.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	181
5.6 Vorschläge zur Taxonomie der Herpesviren	183
6 Zusammenfassung	185
7 Summary	187
8 Literaturverzeichnis	189

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Seit der Ersterwähnung einer seuchenhaft verlaufenden, der Psittakose ähnlichen Krankheit bei Vögeln der Ordnung Psittaciformes (PACHECO und BIER, 1930) sowie der Identifizierung einer Herpesvirusätiologie durch SIMPSON et al. im Jahre 1975 erschien eine große Anzahl von Veröffentlichungen über die im folgenden als Pacheco'sche Papageienkrankheit (PPD) bezeichnete Erkrankung.

Aufgrund der weltweiten Verbreitung und des seuchenhaften Krankheitsverlaufs mit hoher Infektiosität, Morbidität und Mortalität ist diese Herpesvirusinfektion von großer Bedeutung für Papageienbestände. Eine besondere und ständige Gefährdung zum Krankheitsausbruch besteht vor allem bei Haltungsformen mit hoher Fluktuation und nach Stresseinwirkung, wie z.B. während der Quarantänezeit, bei Händlern, auf Ausstellungen und Vogelbörsen.

In den letzten 15 Jahren ist deutlich geworden, dass es sich bei dem Erreger der PPD nicht um ein antigenetisch einheitliches Psittaziden-Herpesvirus (PsHV), sondern um eine Vielzahl unterschiedlicher Subtypen handelt. 1988 wurden erstmals von KRAUTWALD et al. zwei „neue“ Herpesviren beschrieben, welche sich anhand des Krankheitsbildes und der pathologischen Veränderungen sowie serologisch deutlich von den bis dahin gefundenen Isolaten unterschieden. Weitere Untersuchungen von SPENKOCH-PIPER (1993) an 26 verschiedenen Isolaten aus Papageien mit PPD bestätigten die serologische Heterogenität innerhalb der Gruppe der PsHV. TRITT (1985) und GRAVENDYCK et al. (1996) konnten mittels serologischer Kreuzneutralisationstests unter Verwendung der Clusteranalyse fünf PsHV-Serotypen unterscheiden. Zusätzlich haben Vergleiche einer ausgewählten Anzahl von PsHV-Isolaten nach Verdau des gesamten Genoms durch Restriktionsendonukleasen ein signifikantes Ausmaß an genetischen Polymorphismen aufgezeigt (AINI et al., 1993; GÜNTHER et al., 1997; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999; SCHRÖDER-GRAVENDYCK et al., 2001). Anhand der gefundenen Restriktionsmuster konnte außerdem eine weitere Unterteilung der Serotypen in Restriktionssubtypen vorgenommen werden (SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999).

Aus den Sequenzdaten eines PsHV entwickelten TOMASZEWSKI et al. (2001) ausgehend vom variablen Abschnitt des Genoms fünf Primerpaare, welche in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von PsHV-Isolaten aus den USA und Deutschland verwendet wurden. Die entstandenen verschiedenartigen Amplifikationsmuster bewiesen auch bei diesen Untersuchungen, dass als Erreger der PPD mehrere genetisch unterschiedliche PsHV-Varianten vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit werden an über 30 während der letzten 20 Jahre in Europa isolierten Herpesviren aus Papageien durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen sowie durch Amplifikation mit den 5 von TOMASZEWSKI et al. (2001) entwickelten Primern in der PCR weitere Untersuchungen zur Heterogenität der PsHV und zu einer möglichen übersichtlichen Einteilung derselben durchgeführt. Zusätzlich wird versucht, eventuell vorhandene Unterschiede zwischen bereits etablierten Serotypen mittels Western Blot auf Proteinebene genauer darzustellen.

Des Weiteren soll die Methode PCR auf ihre Eignung bzw. Praxistauglichkeit als Diagnostikum zum schnellen Nachweis einer PsHV-Infektion insbesondere im Hinblick auf das Vorkommen unterschiedlicher Varianten untersucht und beurteilt werden. Hierbei wurde neben der von TOMASZEWSKI et al. (2001) beschriebenen PCR mit Vervielfältigung ausgehend vom variablen Abschnitt des PsHV-Genoms auch die von VANDEVANTER et al. (1996) veröffentlichte consensus primer PCR getestet, bei der eine hochkonservierte Region der herpesviralen DNA-abhängigen DNA-Polymerase amplifiziert wird.

Der Einsatz einer PCR, welche in der Lage ist, eine PsHV-Infektion frühzeitig sowohl im Sektionsmaterial von an PPD gestorbenen Tieren nicht nur zu diagnostizieren, sondern zusätzlich auch noch zu charakterisieren bzw. einer bestimmten Gruppe zuzuordnen, würde einen großen Zeitgewinn und dadurch eine gezielte und frühzeitige Behandlung betroffener oder gefährdeter Bestände ermöglichen. Wenn es darüber hinaus gelingen würde, das PsHV in Tupferproben oder im Blut lebender Papageien nachzuweisen, könnten auf diese Art persistent infizierte Virusträger entdeckt und von

empfindlichen Tieren getrennt werden. Eine sichere Identifizierung inapparenter Carriervögel wäre auch insbesondere im Hinblick auf Artenschutzprojekte und damit einhergehende Zucht- und Auswilderungsvorhaben von unschätzbarem Wert, weil dadurch eine mögliche Einschleppung von PsHV in vom Aussterben bedrohte wildlebende Psittazidenpopulationen ausgeschlossen werden könnte.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Pacheco'sche Papageienkrankheit (PPD)

2.1.1 Einleitung

Die Pacheco'sche Papageienkrankheit ist eine durch verschiedene PsHV hervorgerufene, oftmals tödlich endende Infektionskrankheit mit akutem bis protrahiertem oder subklinischem Verlauf. Aufgrund ihrer weltweiten Verbreitung ist sie von großer Bedeutung für zahlreiche Papageienspezies und verursacht vor allem in größeren Beständen bedeutende Verluste (GRAHAM, 1980; HELFER et al., 1980; KALETA, 1990; TSAI et al., 1993; GERLACH, 1994; KALETA, 1999 u. 2003). Das Wirtsspektrum ist auf Vögel der Ordnung Psittaciformes beschränkt, wobei es aber bei den einzelnen Spezies artspezifische Abstufungen in der Empfindlichkeit zu geben scheint. Wahrscheinlich sind alle Spezies zwar infektions-, nicht jedoch krankheitsempfänglich (GRAHAM, 1980; GASKIN et al., 1981; CAVILL, 1982; ROSSKOPF et al., 1982; KALETA, 1999 u. 2003). So zeigen sich Amazonen und Graupapageien am empfänglichsten, da sie gewöhnlich perakut ohne vorherige Krankheitsanzeichen oder aber innerhalb weniger Stunden nach dem Auftreten von klinischen Symptomen sterben. Auch für Arten der Gattung Kakadu und Ara endet die Infektion meist letal; jedoch erkranken diese häufig an der subakuten Verlaufsform. Die wenigen überlebenden Vögel entwickeln in der Regel eine lebenslange Immunität gegen eine erneute Erkrankung, wobei sich humorale Antikörper jedoch meist nur in der frühen Rekonvaleszenzphase und nur in niedrigen Titerstufen im Neutralisationstest nachweisen lassen (GASKIN, 1979; GRAHAM, 1980; HITCHNER und CALNEK, 1980; ROSSKOPF et al., 1982; CARTWRIGHT et al., 1985; GASKIN, 1987; GASKIN, 1988; KRAUTWALD et al., 1988; GASKIN, 1989; KALETA, 1999 u. 2003).

Sittiche hingegen scheinen generell resistenter gegen einen akuten Krankheitsausbruch zu sein. So berichten viele Autoren, dass die Infektion bei Felsen- (*Cyanoliseus patagonus*), Nanday- (*Nandayus nenday*) und Pavuasittichen (*Aratinga leucophthalmus*), aber auch bei Wellen- (*Melopsittacus undulatus*) und Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) trotz nachgewiesener Virusausscheidung oft inapparent oder mild bis subklinisch verläuft (GASKIN et al., 1979; GASKIN et al. 1981, CAVILL, 1982; ROSSKOPF et al., 1982; SPENSER 1991; STEINKE und MUNDT, 1997; KALETA, 1999 u. 2003). Diese Beobachtung wird auch von GILARDI et al. (1996) bestätigt, die bei Screening-Untersuchungen an klinisch gesunden freilebenden Braunkopfsittichen (*Aratinga weddellii*) in Peru Antikörper gegen PsHV nachweisen konnten.

Krankheitsbild, Verlauf und Ausgang einer PsHV-Infektion sind jedoch außer von der betroffenen Psittazidenspezies auch deutlich abhängig vom Serotyp des infizierenden Virus (KRAUTWALD et al., 1988; MUTLU et al., 1991; CHEESEMAN u. RIDDELL, 1995; WIESNER und RIBBECK, 1999; KALETA, 1999 u. 2003).

2.1.2 Geschichtlicher Überblick zur PPD

Beschreibungen einer der Psittakose ähnlichen infektiösen Erkrankung mit hoher Mortalität bei südamerikanischen Papageien wurden erstmals im Jahre 1930/1931 von PACHECO und BIER veröffentlicht. Nach der humanen Psittakose-Pandemie, die im Winter des Jahres 1929/1930 in Europa und den USA auftrat, führten die beiden Wissenschaftler Untersuchungen zum Vorkommen der Psittakose in Brasilien durch. Dabei stießen sie sowohl in einer Volierenhaltung als auch auf einem Vogelmarkt auf eine seuchenartige Krankheit bei brasilianischen Papageien der Spezies Blaustirnamazone (*Amazona aestiva aestiva*), Venezuela-Amazone (*Amazona amazonica*) und Mülleramazone (*Amazona farinosa*). Obwohl der Erreger der Psittakose zu dieser Zeit bereits identifiziert worden war, war der Übertragungsweg von „*Salmonella psittacosis* von Nocard“ dennoch nicht vollkommen bekannt. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen von PACHECO und BIER von der noch

herrschenden Verwirrung und Unklarheit in Bezug auf die Pathogenese dieser Krankheit sicherlich beeinflusst. PACHECO und BIER (1930) stellten nach ersten Filtrations- und Isolierungsversuchen fest, dass ein filterdurchgängiges „Virus“ an der Krankheitsentstehung beteiligt sein musste. Dieses Virus ließ sich ohne Schwierigkeiten auf Tuisittiche (*Brotogeris sanctithomae sanctithomae*) übertragen; wobei die dadurch verursachte Krankheit in ihrer Symptomatik sowie den pathologisch-anatomischen Befunden (MEYER, 1931) der Psittakose stark ähnelte. Da jegliche Versuche, die Infektion auf Meerschweinchen, Mäuse, Tauben, Hühner oder Affen zu übertragen, scheiterten, kamen PACHECO und seine Kollegen zu der Schlußfolgerung, daß es sich bei der beobachteten Erkrankung zwar um Psittakose handelte, der Erreger jedoch eine streng an Psittaziden adaptierte Variante darstellte. Sie sandten das isolierte infektiöse Material zwecks näherer Charakterisierung zu RIVERS und SCHWENTKER ins Rockefeller Institut, N.Y., USA, wo diese durch weitere experimentelle Untersuchungen in den Jahren 1931 und 1932 feststellten, daß es sich eindeutig nicht um den Erreger der Psittakose, sondern um ein filtrierbares papageienspezifisches Virus handelte. Aufgrund der histologischen Veränderungen wurde schon damals eine Herpesvirusätiologie vermutet. Auch RIVERS und SCHWENTKER (1932) gelang es nicht, den Erreger auf Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen und Kanarienvogel zu übertragen. Eine Übertragung auf 10 Tage alte Hühnerembryonen war jedoch erfolgreich; diese starben regelmäßig 3 bis 5 Tage nach Inokulation des Virus in die Allantoishöhle ab. Passagen in embryonierten Hühnereiern konnten ebenfalls ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden. Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*) wurden in den Übertragungsversuchen ebenfalls benutzt; bei dieser Spezies manifestierte sich die Krankheit durch protrahierten Verlauf mit gestäubtem Gefieder, Schwäche, Abmagerung und z. T. Tod innerhalb von 8-10 Tagen.

Das Krankheitsbild wurde im Folgenden als Pacheco'sche Papageienkrankheit (PPD) bezeichnet (FINDLAY, 1933; ANDREWES und PEREIRA, 1972).

Obwohl bereits 1930 erstmalig beschrieben, wurde die PPD erst in den frühen 70er Jahren in Papageienhaltungen in Florida wiedererkannt bzw. diagnostiziert (SIMPSON und HANLEY, 1975). Kurze Zeit später wurden zahlreiche Berichte über Krankheitsausbrüche in Kenia (KALINER, 1975), Neuseeland (DURHAM et al., 1977),

Deutschland (WINTEROLL, 1977), der Schweiz (EHRSAM et al., 1978), England (MARTIN et al., 1979) sowie mehreren Orten in den USA (COOPER und HOWARD, 1977; SIMPSON und HANLEY, 1977; HIRAI et al., 1979; MILLER et al., 1979) veröffentlicht. Einen ausführlichen Literaturüberblick zu diesem Thema bis zum Jahre 1992 liefert die Dissertationsschrift von HEINRICHS (1992).

Im Jahre 1975 wurde schließlich von SIMPSON und HANLEY mittels Elektronenmikroskopie und Filtrationsstudien sowie aufgrund der chemischen Eigenschaften ein Herpesvirus als Erreger dieser für Papageien verlustreichen Erkrankung identifiziert. Auch Untersuchungen von RANDALL et al. (1979), MILLER et al. (1979) und CHO und McDONALD (1979) verifizierten dies.

2.1.3 Klinisches Bild (Symptomatik)

Die klinische Symptomatik ist im allgemeinen sehr unspezifisch. Nach Erstinfektion krankheitsempfänglicher Spezies auf natürlichem Wege beträgt die Inkubationszeit zwischen 6 bis 10 Tagen (GASKIN et al., 1980; HITCHNER und CALNEK, 1980; YORK und YORK, 1983; KALETA, 1999 u. 2003). Der plötzliche Tod völlig gesund erscheinender Tiere wird in allen Quellen als typischer Beginn der PPD gesehen.

Neben diesem perakuten gibt es den akuten Verlauf, welcher in der Regel innerhalb von 24 Stunden mit dem Tod endet. Die häufigsten spezifischen Symptome hierbei sind Diarrhoe in Form von wäßrigem, oft intensiv gelb-grün gefärbtem Kot, der später auch zum Teil mit Blut vermischt ist. Die gelb-grüne Farbe stammt vom Bilirubin und ist Indikator schwerster Leberschädigung (PACHECO und BIER, 1931; MEYER, 1931; EHRSAM et al., 1978; CARTWRIGHT et al., MUTLU et al., 1985 u. 1991; O'TOOLE et al., 1992). In den meisten Fällen stellt sich zusätzlich auch Polyurie mit ebenfalls durch Bilirubin gelb-grünlich gefärbter Harnsäureausscheidung ein. Daraus resultierend ergeben sich Dehydratation und Polydipsie ((PACHECO und BIER, 1931; MEYER, 1931; EHRSAM et al., 1978; CARTWRIGHT et al., 1985; MUTLU et al., 1985 u. 1991; 1985, O'TOOLE et al., 1992). In Einzelfällen können auch Erbrechen,

Sinusitiden, ein- oder beidseitige Konjunktivitiden, Aerosacculitiden, Ösophagitiden sowie tonisch-klonische Krämpfe oder Zittern der Nacken-, Flügel- oder Beinmuskulatur auftreten (CHEESEMAN u. RIDDELL, 1994; MUTLU et al. 1991; HELFER et al., 1980; WIESNER u. RIBBECK, 1999). Veränderungen des Respirationstraktes treten häufig als Nebenfund auf (TSAI et al., 1993; ESKENS et al., 1994; MAGNINO et al., 1996).

Beim subakuten Verlauf kann eine sich verschlimmernde Symptomatik in Form von Inappetenz und Abmagerung, Apathie und Somnolenz mit gestäubtem Gefieder und geschlossenen Augen sowie Vomitus, Diarrhoe und Polydipsie beobachtet werden (HARRISON u. HARRISON, 1986; GYLSTORFF u. GRIMM, 1987). Der Tod tritt bei dieser Verlaufsform meist nach 5 bis 7 Tagen ein. GYLSTORFF u. GRIMM (1987) dagegen konnten einen protrahierten Krankheitsverlauf mit weniger hohen Verlustraten und Durchseuchung des Bestandes innerhalb von 9 bis 14 Tagen beobachten.

Verschiedene Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen einer latenten Infektion mit Herpesviren und dem Auftreten von Kloakenpapillomen im Rahmen der als IPP (internal papillomatosis of parrots) bezeichneten Erkrankung bei Psittaziden. GOODWIN und McGEE (1993) beschrieben die Entdeckung von Herpesvirionen und intranukleären Einschlusskörperchen im Gewebe eines Kloakenpapilloms von einem Orangerhaubenkakadu (*Cacatua sulphurea citrinocristata*). Serologische Untersuchungen von PHALEN et al. (1997) zeigen darüberhinaus eine hohe Prävalenz herpesvirusspezifischer Antikörper in Psittazidenpopulationen mit IPP. Bei der Untersuchung operativ entfernter Kloakenpapillome von insgesamt 12 an IPP erkrankten Psittaziden konnten JOHNE et al. (2002) mittels PCR herpesvirale DNA im Gewebe von 5 Papillomen nachweisen. Die im Anschluß daran durchgeführte Sequenzierung der amplifizierten DNA ergab beim Vergleich mit den in der GenBank hinterlegten Nukleotidsequenzen den höchsten Grad an Übereinstimmung mit Teilsequenzen des Gens für die DNA-Polymerase des PsHV-1. Ein Nachweis von Polyoma- oder Papillomaviren dagegen gelang den Autoren nicht.

Eine übersichtliche und vollständige Darstellung der in den einzelnen Quellen bis zum Jahre 1992 beschriebenen Symptome und Verlaufsformen der PPD findet sich in der Dissertationsschrift von HEINRICHS (1992).

2.1.4 Pathologie der PPD

2.1.4.1 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Die pathologisch-anatomischen Befunde sind unspezifisch und variieren je nach vorangegangenem klinischem Bild (SIMPSON et al., 1975; SIMPSON u. HANLEY, 1977; RANDALL et al., 1979; CHO et al., 1980; GRAHAM, 1980; DHARMA u. SUDANA, 1983; PANIGRAHY u. GRUMBLES, 1984; KRAUTWALD et al., 1988; MUTLU et al., 1991; CANTI et al., 1992). Makroskopisch sichtbare pathologische Organveränderungen manifestieren sich insbesondere an Leber und Milz sowie am Magen-Darm-Trakt (EHRSAM et al., 1978; GASKIN et al., 1979; PANIGRAHY und GRUMBLES, 1984; LOUZIS et al., 1985; KRAUTWALD et al., 1988; MUTLU et al., 1991; ESKENS et al., 1994).

Die Leber ist fast immer massiv geschwollen, und neben multiplen Nekrosen treten petechiale Blutungen auf. Splenomegalie und subkapsuläre petechiale Blutungen werden in den meisten Fällen ebenfalls diagnostiziert.

Am Digestionstrakt fallen massive Gefäßinjektionen, katarrhalische bis hämorrhagische Enteritis sowie gelegentlich petechiale Blutungen in der Serosa des Proventriculus auf. Seltener werden daneben auch vergrößerte Nieren mit gelblich-cremigem Inhalt in den Harnleitern (KRAUTWALD et al., 1988) sowie Veränderungen am Respirationstrakt in Form von Sinusitis, Tracheitis oder Aerosacculitis (WINTEROLL, 1977) beobachtet.

Nach perakutem Verlauf sind makroskopisch kaum Organveränderungen zu sehen (SIMPSON et al., 1975; COOPER und HOWARD, 1977; KALETA, 1999 u. 2003).

Von verschiedenen Autoren wird ein möglicher Zusammenhang zwischen einer latenten Herpesvirusinfektion und dem Auftreten von Kloakenpapillomen im Rahmen des

Krankheitskomplexes der IPP vermutet (vgl. Punkt 2.1.3). Bei der IPP handelt es sich um eine bei Psittaziden auftretende Tumorerkrankung, welche durch die Entstehung und fortschreitende Ausbildung von Papillomen sowohl in der Mund- und Kloakenschleimhaut als auch im oberen Gastrointestinaltrakt gekennzeichnet ist (GRAHAM, 1988; PHALEN et al., 1997; KRAUTWALD et al., 2000).

2.1.4.2 Pathologisch-histologische Veränderungen

Das histologische Bild wird von Hämorrhagien und herdförmigen Koagulationsnekrosen mit lediglich geringgradiger Infiltration von Entzündungszellen in zahlreichen Organen dominiert (MUTLU et al., 1991). Eosinophile, seltener basophile Kerneinschlüsse können oft zahlreich in Hepatozyten und Gallengangsepithelien im Randbereich der nekrotischen Bezirke angetroffen werden (COOPER und HOWARD, 1977; WINTEROLL, 1977; GILBERT et al., 1984; CARTWRIGHT et al., 1985; ARNOLD, 1990; RAMIS et al., 1994; ESKENS et al., 1994; KALETA, 1999 u. 2003), wobei die Anzahl der charakteristischen Kerneinschlüsse jedoch von Vogel zu Vogel variiert, so daß in manchen Fällen nur wenige oder gar keine Einschlußkörperchen nachweisbar sind (TOMASZEWSKI et al., 2001).

Gegenüber den relativ charakteristischen histologischen Läsionen in der Leber sind die Veränderungen in anderen Organen weniger ausgeprägt oder fehlen ganz. Intranukleäre Einschlußkörperchen vom Typ Cowdry-A finden sich gelegentlich in geringerer Zahl auch in den Retikulumzellen der Milz, den Glomerulumzellen der Nieren, im Darmepithel, den Bronchialepithelien sowie in Pankreas, Haut und Blutkielen (SIMPSON und HANLEY, 1976; MEULEMANS et al., 1978; WINTEROLL und GYLSTORFF, 1979; RANDALL et al., 1979; MILLER et al., 1979; KALETA et al., 1980; DHARMA und SUDANA, 1982; PANIGRAHY und GRUMBLES, 1984; TSAI et al., 1993; ESKENS et al., 1994; MAGNINO et al., 1996).

Bei der Untersuchung operativ entfernter Kloakenpapillome von insgesamt 12 an IPP erkrankten Psittaziden konnten JOHNE et al. (2002) mittels PCR herpesvirale DNA im

Gewebe von 5 Papillomen nachweisen. Bei der im Anschluß durchgeführten in-situ-Hybridisierung an Dünnschnitten eines der PCR-positiven Kloakenpapillome wurden Herpesvirussequenzen in den im Zentrum des Papilloms gelegenen Epithelzellen gefunden. Im das Papillom umgebenden Gewebe dagegen wurde keine herpesvirale DNA detektiert.

2.1.5 Epidemiologie

Die Epidemiologie der PPD ist bis heute nur teilweise aufgeklärt. Viele Krankheitsausbrüche stehen in Zusammenhang mit kürzlich importierten Vögeln, welche direkt nach Entlassung aus der Quarantäne an Züchter oder Händler verkauft wurden. In diesen Fällen befanden sich die Importtiere in der Inkubationszeit der PPD und starben in der Regel drei bis vierzehn Tage nach Umsetzung in die empfängliche Population (SIMPSON und HANLEY, 1975; WINTEROLL, 1977; EHRSAM et al., 1978; MEULEMANS et al., 1978; MILLER et al., 1979; RANDALL et al., 1979; KALETA et al., 1980; GILBERT et al., 1984).

Es gibt jedoch Berichte sowohl über ein Auftreten von PPD kurz nach der Verbringung von offensichtlich gesunden, selber niemals erkrankten Vögeln in empfängliche Populationen als auch über Krankheitsausbrüche in seit mehreren Jahren geschlossenen Zuchtbeständen, wo keine exogene Ansteckungsquelle identifiziert werden konnte. Dies legt die Vermutung einer Existenz von gesunden, das Virus latent in sich tragenden Vögeln sehr nahe (TRAPP et al., 1977; GRAHAM, 1980; GASKIN et al., 1981; CAVILL, 1982; ROSSKOPF et al., 1982; PANIGRAHY und GRUMBLES, 1983; CARTWRIGHT, 1985; GASKIN, 1989; STEINKE und MUNDT, 1997).

Ergebnisse serologischer Screeninguntersuchungen bei sowohl in der freien Wildbahn lebenden als auch unter Menschenobhut gehaltenen Psittaziden bestätigen letztere Vermutung und machen deutlich, dass nicht alle PsHV-Infektionen Krankheitsausbrüche zur Folge haben bzw. dass viele Papageien, die einen solchen Ausbruch überlebt haben und dabei nur mild oder gar nicht erkrankt sind, inapparent infiziert worden sind (GASKIN et al., 1981; GASKIN, 1989; KRAUTWALD et al.,

1988; GILARDI et al., 1995). Demnach ist das PsHV wie alle Herpesviren in der Lage, bei diesen überlebenden Tieren eine latente Virusinfektion zu verursachen, die über Monate, Jahre oder sogar lebenslang bestehen bleibt. Das Virus persistiert hierbei in den Ganglienzellen sensorischer Nerven (ARNOLD, 1990) und wird von den sogenannten Carriervögeln entweder kontinuierlich oder intermittierend ausgeschieden (GASKIN et al., 1981; PANIGRAHY und GRUMBLES, 1984; GERLACH, 1984; ARNOLD, 1990), d.h. Phasen mit Virusausscheidung und mit oder ohne klinische Manifestation wechseln ab mit klinisch inapparenten Phasen ohne Ausscheidung. Die latente Infektion ist durch Immunsuppression aufgrund von exogenen oder endogenen Noxen jederzeit aktivierbar. So treten seuchenhafte Ausbrüche typischerweise ein bis drei Wochen nach Stresseinwirkung, z.B. nach Neuerwerb, klimatischen Veränderungen, Operationen, Umsetzen, Transport oder Ausstellungen auf (GASKIN et al., 1981; GASKIN, 1988; ARNOLD, 1990; KALETA, 1999 u. 2003).

Auch durch iatrogen zugeführte Medikamente wie Glukokortikoide oder Zytostatika sowie durch Hormonausschüttung bei Beginn der sexuellen Aktivität in der Brutsaison kann die Virusreplikation und –ausscheidung reaktiviert werden (GASKIN et al., 1981; CASTRO, 1984).

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen von GASKIN et al. (1981) legen nahe, daß nicht nur mehrere südamerikanische Sittichspezies, sondern auch viele Arten von Großpapageien wie z. B. Amazonen, Kakadus und Aras Virusträger und -ausscheider sein können.

Beim Übertragungsweg besitzt die horizontale Weitergabe des Virus die größte Bedeutung. Nach einer kurzen Virämie wird der Erreger mit den Fäzes (PACHECO und BIER, 1931; HIRAI et al., 1979; YORK und YORK, 1983; KALETA, 1990) oder mit Nasen-, Rachen- und Konjunktivalsekreten (GASKIN et al., 1979; SMITH et al., 1987) ausgeschieden. Für eine vertikale Übertragung liegen keine gesicherten Daten vor. Die Virusaufnahme erfolgt über virushaltige Sekrete durch engen Kontakt oder oral via Koprophagie oder fäkale Kontamination von Futter und Trinkwasser (GASKIN et al., 1979; PETRAK, 1982; CASTRO et al., 1984). Trotz seiner relativ geringen Tenazität

kann das Virus außer durch latent infizierte oder kranke Tiere auch durch kontaminierte Gegenstände in bisher krankheitserregerfreie Bestände eingeschleppt werden.

2.1.6 Pathogenese

Nach der ersten Aufnahme des Erregers kommt es in krankheitsempfänglichen Psittazidenspezies zuerst zur Virusvermehrung an der Eintrittspforte (Rachen, Respirationstrakt) und dann zu einer langanhaltenden Virämie, in deren Verlauf der Tod eintritt, so dass das Virus in den meisten Fällen aus zahlreichen Organen isoliert werden kann (KALETA, 1999 u. 2003). Die Untersuchungsergebnisse zum Eintritt, zur Vermehrung und Art der Ausbreitung des Erregers sowie zum betroffenen Organspektrum und der Virusausscheidung nach natürlicher Infektion sind größtenteils noch unvollständig oder spekulativ. YORK und YORK (1983) stellten bei klinisch kranken Vögeln nach experimenteller Infektion eine sehr hohe Ausscheidung von Virus in allen Se- und Exkreten fest. Untersuchungen von über 52 verschiedenen Geweben und Organen von 18 akut an PPD gestorbenen Papageien zeigten, dass sich das PsHV im Verlauf der Virämie in nahezu allen untersuchten Proben nachweisen ließ, wobei die Isolierung aus dem Blutgefäß-, Nerven- und Respirationssystem sowie der Leber bei jedem Tier gelang. Die höchsten Titer wurden hierbei im Herzblut, der Leber, den Luftsäcken, dem Nervus vagus und den Blutkielen der Federn gefunden (GRAVENDYCK et al., 1998).

Es gibt jedoch auch Berichte, nach denen die direkte Virusisolierung auf Zellkulturen aus den Organen an PPD gestorbener Tiere in nur 58% aller Fälle gelungen ist, wohingegen mittels PCR bei allen untersuchten Vögeln PsHV nachgewiesen werden konnte (TOMASZEWSKI et al., 2001, siehe auch unter Punkt 2.1.7).

Die Pathogenese einer reaktivierten latenten Infektion verläuft nahezu identisch zur Erstinfektion. Auch hier kommt es zwei bis drei Tage nach Einwirkung von Stressoren zu einer Virämie, die dann bei krankheitsempfänglichen Spezies zu typischen Symptomen oder zum Tod führt (WINTEROLL, 1977; GASKIN et al., 1981;

PANIGRAHY und GRUMBLES, 1984; GASKIN, 1989; ARNOLD, 1990; KALETA, 1999 u. 2003).

2.1.7 Diagnose

Beim erkrankten, noch lebenden Vogel kann anhand der anamnestischen, klinischen, labordiagnostischen sowie ggf. röntgenologischen und sonographischen Befunde nur eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Nur bedingt charakteristisch sind die bereits beschriebenen akuten, unspezifischen Symptome wie plötzliche Todesfälle, Apathie und gelblicher Durchfall.

Röntgenologisch und sonographisch fallen eine Schwellung von Leber, Milz und Nieren und ein erweiterter Darmkanal auf (KALETA, 1999 u. 2003).

Bei einer Blutuntersuchung liegt regelmäßig eine Leukopenie vor; im Serum ist aufgrund der Lebernekrosen fast immer eine erhöhte Aspartat-Amino-Transferase-Aktivität feststellbar (GODWIN et al., 1982).

Die eindeutige Diagnose einer PPD wurde bisher am lebenden Vogel nur aufgrund von Virusisolierung aus dem Kot und aus Tupferproben von Rachen und Kloake gestellt (GASKIN et al., 1981).

Post mortem kann bei der Sektion anhand der in Kapitel 2.1.4 beschriebenen makroskopisch erkennbaren Organveränderungen eine Verdachtsdiagnose PPD gestellt werden, die sich dann durch die typischen histologischen Befunde mit intranukleären Einschlusskörperchen nach Untersuchungen von ESKENS et al. (1994) und RITCHIE (1995) mit großer Treffersicherheit erhärten lässt, insbesondere dann, wenn zusätzlich das Virus immunhistochemisch in Abklatschpräparaten (GRAHAM, 1980) oder in Paraffinschnitten (RAMIS et al., 1994) mehrerer Organe nachgewiesen werden kann. Die Virusisolierung und -vermehrung des PsHV aus Organ- und Gewebematerial von Sektionstieren auf Hühnerembryofibroblasten (HEF)-Kulturen mit anschließender chemischer und elektronenmikroskopischer Identifizierung als Herpesvirus ist die

bislang am häufigsten eingesetzte Methode zur Diagnose der PPD (MARTIN et al., 1979; CHO und McDONALD, 1980; GRAHAM, 1980; PANIGRAHY und GRUMBLES, 1984; GRAVENDYCK et al., 1996; GÜNTHER et al., 1997; GRAVENDYCK et al., 1998). Im Vergleich zu anderen Methoden ist die Isolierung auf Zellkulturen jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig, da bis zur Vermehrung des Virus mit sichtbarem zytopathischen Effekt (cpE) mehrere Blindpassagen notwendig sein können. Einer Untersuchung von TOMASZEWSKI et al. (2001) zufolge erweist sich die direkte Erregeranzüchtung im Vergleich zur PCR auch als signifikant weniger sensitiv. So konnten TOMASZEWSKI et al. (2001) mit der PCR-Methode in allen untersuchten Proben PsHV-DNA nachweisen, wohingegen die Virusisolierung auf primären Hühnerembryofibroblasten-Kulturen in nur 58% aller Fälle gelang. Eine direkte Erregeranzüchtung ist jedoch immer dann nötig, wenn ein bestandsspezifischer Impfstoff hergestellt werden soll (KALETA, 1999 u. 2003; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999) (siehe auch unter Punkt 2.1.8).

Als schnelle Diagnosemöglichkeiten stehen außerdem die direkte elektronenmikroskopische Untersuchung des Überstandes von zerkleinertem Organ- und Gewebematerial (GOMEZ-VILLAMANDOS et al., 1991; TSAI et al., 1993) sowie ein ELISA mit monoklonalen Antikörpern zum direkten oder indirekten Nachweis einer PsHV-Infektion zur Verfügung (ABDALA, 1994).

RAMIS et al. (1994) sowie JOHNE et al. (2003) berichten ferner über einen direkten Nachweis von PPD im Gewebe durch in situ-Hybridisierung mit PsHV-spezifischen DNA-Sonden.

TOMASZEWSKI et al. (2001) entwickelten eine PCR, mit der es ersten Untersuchungen zufolge möglich ist, das Virus sowohl im Sektionsmaterial als auch in Tupferproben oder im Blut lebender Vögel nachzuweisen. Gleichzeitig ist durch die Verwendung unterschiedlicher Primer, welche zu verschiedenen Segmenten des variablen Abschnitts des PsHV-Genoms komplementär sind, auch eine Differenzierung und Einteilung der PsHV möglich. Die Autoren berichten, dass diese PCR ein schnelles und gleichzeitig sehr sensitives Verfahren zum Nachweis einer PsHV-Infektion ist.

2.1.8 Therapie

Als symptomatische und unterstützende therapeutische und auch prophylaktische Maßnahmen werden in der Literatur die Verabreichung von Leberschutzpräparaten, hohe Gaben von Vitamin C (50 mg/kg KM), Flüssigkeitszufuhr sowie allgemeine seuchenhygienische Maßnahmen wie Desinfektion und Verbesserung der hygienischen Bedingungen genannt (HARRISON und HARRISON, 1986; GYLSTORFF und GRIMM, 1987; GERLACH, 1987; STEINKE und MUNDT, 1997).

In neuerer Zeit wird immer wieder auf den Einsatz der Guanosinantimetabolite Aciclovir (Zovirax®) und Ganciclovir („Acycloguanosine“) als mögliche Therapie von aviären Herpesvirus-erkrankungen hingewiesen (ROSSKOPF, 1987; SMITH, 1987; PARROT, 1990; ARNOLD, 1990; SPENSER, 1991; KALETA, 1999 u. 2003). Es handelt sich hierbei um die einzige beschriebene, kausale Therapie. Aciclovir wird in der Humanmedizin mit Erfolg gegen systemische Varizella-Zoster- und Herpes-simplex-Erkrankungen als Virostatikum eingesetzt; das etwas toxischere Ganciclovir findet bei Patienten mit Immunschwäche oder Immunsuppression oder anderen schweren Cytomegalievirus-Infektionen Anwendung (FORTH et al., 1996).

Um antiviral wirksam zu sein, müssen beide azyklischen Guanosinanaloge in Triphosphate überführt werden. Aciclovir erreicht hierbei besonders gute Selektivität und Aktivität, weil es als Substrat eines in herpesvirusinfizierten Zellen vorliegenden Enzyms, der virusinduzierten Thymidinkinase, aktiv zum Aciclovir-Monophosphat umgewandelt und von der zellulären Thymidinkinase nicht als Substrat akzeptiert wird. Die nachfolgenden Phosphorylierungen zum Aciclovir-Triphosphat werden durch wirtszelleigene Kinasen ausgeführt. Das auf o.g. Weise komplettierte Aciclovir-Triphosphat hat zur viralen DNA-Polymerase eine 30-fach höhere Affinität als zur wirtszelleigenen DNA-Polymerase. Dadurch wird es polymerasevermittelt als Acycloguanosintriphosphat anstelle von Desoxyguanosintriphosphat in die wachsende Virus-DNA eingebaut. Es kommt zum Kettenabbruch und weitere Nukleotide können nicht mehr angelagert werden, wodurch die Virus-Biosynthese in der infizierten Körperzelle spezifisch gehemmt wird.

Ganciclovir ist ein ähnliches Nucleosidanalogen. Es wird in analoger Weise von der Thymidinkinase phosphoryliert, in die DNA eingebaut und führt zum Kettenabbruch. Es unterscheidet sich von Aciclovir vor allem durch eine vergleichsweise geringere Selektivität, da es auch in nichtinfizierten Zellen mäßig phosphoryliert wird. Eine Therapie mit Ganciclovir ist aus diesem Grunde viel nebenwirkungsreicher als die mit Aciclovir (BURROUGHS-WELLCOME, 1986; FORTH et al., 1996).

NORTON et al. (1991) führten in vivo an experimentell mit PsHV infizierten Mönchsittichen (*Myopsitta monachus*) Versuche zur Pharmakokinetik von Aciclovir bei erkrankten Psittaziden durch. Nach Erfahrung der Autoren hat eine intramuskuläre Injektion des Wirkstoffes häufig massive Gewebnekrosen rund um die Injektionsstelle zur Folge und sollte daher durch orale Gaben über das Futter ersetzt werden. Die therapeutisch wirksame und gleichzeitig am besten verträgliche Dosis beträgt 80 mg/kg KM im Abstand von 8 Stunden über einen Zeitraum von 7 Tagen. Hierbei ist zur Aufrechterhaltung eines konstanten Wirkspiegels eine exakte Dosierung unbedingt erforderlich, was die individuelle Verabreichung des Medikamentes direkt in den Schnabel notwendig macht. Eine signifikant höhere Überlebensrate bei den mit dieser Dosierung behandelten Vögeln im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren konnten die Autoren allerdings nur erzielen, wenn mit der Behandlung schon frühzeitig in der Inkubationszeit begonnen wurde. In vitro-Versuche an infizierten Hühnerembryofibroblasten-Kulturen haben außerdem gezeigt, daß nur durch Einsatz von relativ hohen, zytotoxischen Aciclovirkonzentrationen eine Reduktion des Antigeniters erzielt werden kann (ESKENS et al., 1994). Eine gänzliche Unterbindung der Virusreplikation mit noch nicht zytotoxischen Konzentrationen des Wirkstoffes ist bei diesen Untersuchungen nicht gelungen. Da zusätzlich zu den genannten Risiken und Nebenwirkungen eine Therapie mit Aciclovir nicht nur sehr kosten-, sondern aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit beim Vogel und der Notwendigkeit einer individuellen Behandlung auch äußerst zeitintensiv ist, kann die Anwendung des Medikamentes nur unter Vorbehalt empfohlen werden. So erscheint ein Therapieversuch vor allem bei kleineren Beständen oder wertvollen Einzeltieren sinnvoll bzw. praktikabel.

Seuchenausbrüche innerhalb eines größeren Bestandes dagegen können durch die Verabreichung einer bestandsspezifischen, durch Formalin und Hitze inaktivierten und mit Adjuvans versetzten Vakzine (KALETA und BRINKMANN, 1993), welche homologes Virus enthält, wirkungsvoll eingedämmt werden. Es wurden bereits mehrfach Berichte über die erfolgreiche Begrenzung von Enzootien nach Durchführung einer Notimpfung (d.h. Impfung der noch nicht erkrankten Kontaktiere) mit bestandseigenen Impfstoffen veröffentlicht (KALETA und BRINKMANN, 1993; STEINKE und MUNDT, 1997; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999). KALETA und BRINKMANN (1993) berichten über einen deutlichen Anstieg der neutralisierenden Serumantikörper 4 Wochen nach Impfung eines spanischen Papageienbestandes mit einer autologen Vakzine. Bei einem Großteil der geimpften Vögel war eine Serokonversion auch noch 21 Wochen später feststellbar. Eine solche Notimpfung bietet den klaren Vorteil, dass durch Vakzination mit dem homologen Antigen eine subtypspezifische Immunisierung und damit optimale Schutzwirkung erzielt werden kann (siehe auch unter Punkt 2.1.9).

Nachteilig ist dagegen, dass die Herstellung eines solchen Impfstoffes zuerst in Zellkulturen eine Isolierung und anschließende Vermehrung des Virus von einem an PPD gestorbenen Tier aus dem betroffenen Bestand erfolgen muss. Dies nimmt in der Regel ca. zwei bis drei Wochen wertvoller Zeit in Anspruch, da bei Erstisolierung oft mehrere Passagen in der Zellkultur notwendig sind, um einen ausreichend hohen Titer des Impfantigens zu erhalten.

Aus diesem Grunde sollte zur Verhinderung der Virusausbreitung in einem betroffenen Bestand ein konsequentes und effizientes Seuchenmanagement oberste Priorität erhalten (siehe Punkt 2.1.9).

2.1.9 Prophylaxe

Wie bereits in Kapitel 2.1.8 erwähnt, sind zur Verhinderung der Erregereinschleppung und –ausbreitung in einem geschlossenen Bestand allgemeine seuchenhygienische Maßnahmen strikt einzuhalten. Dazu gehört z.B. eine ausreichend lange

Quarantänisierung aller Neuzugänge, die Unterbindung eines direkten Kontakts zwischen einzelnen Gruppen mit räumlicher Trennung von verschiedenen Psittazidenarten sowie eine optimale Gestaltung der Umweltbedingungen durch ein hygienisches Management mit regelmäßiger Reinigung und Desinfektion der Räumlichkeiten und des Futtergeschirrs. In offenen Beständen mit stärkerer Tierbewegung und häufiger Frequentierung durch Menschen (z.B. Zoohandlungen, häufig Ausstellungen besuchende Zuchtbestände, Populationen in zoologischen Gärten) ist zusätzlich eine spezifische Immunprophylaxe sehr empfehlenswert. Alle Psittaziden sollten einmal jährlich mit einem inaktivierten Impfstoff geimpft und nur geimpfte Tiere neu eingesetzt werden. Dies kann bei bereits aufgetretener PsHV-Problematik durch eine bestandseigene Vakzine geschehen (s. hierzu auch unter Punkt 2.1.7).

KALETA und BRINKMANN (1993) berichten über einen im Neutralisationstest deutlich nachweisbaren Anstieg der Serumantikörper nach Impfung mit einer bestandseigenen inaktivierten Vakzine, wobei der Antikörpertiter 4 Wochen post vaccinationem am höchsten war. Bei einem Großteil der geimpften Vögel war eine Serokonversion auch noch 21 Wochen später feststellbar. Im Gegensatz dazu konnten GASKIN et al. sowie HITCHNER und CALNEK in den Jahren 1979 und 1980 in Impfversuchen an Wellen- (*Melopittacus undulatus*) und Mönchssittichen (*Psittacus monachus*) mit einer inaktivierten PsHV-1 Vakzine bei nur wenigen Impflingen relevante Antikörpertiter im Serum nachweisen, obwohl die Tiere im Challenge jedoch gegen eine Infektion mit virulentem PsHV-1 bis zu 10 Monate geschützt waren. Aus diesen Ergebnissen folgerten die Autoren, dass eine PsHV-Infektion vom Immunsystem vor allem durch zelluläre, nicht aber humorale Abwehrmechanismen bekämpft wird, wie es für viele andere Herpesvirusinfektionen bereits nachgewiesen wurde (WUTZLER, 1996; ROIZMAN und SEARS, 1996; MODROW und FALKE, 1997).

Für die spezifische Immunprophylaxe stehen in Deutschland derzeit keine zugelassenen kommerziellen Impfstoffe zur Verfügung. In den USA wird von der Firma Biomune Co., Lenexa, Kansas eine mit Mineralöl adjuvantierte Vakzine (Psittimune PPDV) hergestellt, welche als Antigen ein serologisch mit dem HANLEY-Isolat (SIMPSON et al., 1975) und somit auch dem Isolat KS 144/79 (KALETA, 1979) identisches

inaktiviertes Herpesvirus enthält (Gough und Alexander, 1993). Daher bietet dieser monovalente Impfstoff nur gegen Infektionen mit dem - allerdings am häufigsten vorkommenden - Serotyp 1 des PsHV einen zuverlässigen Schutz. Diese kommerzielle Vakzine kann in Deutschland jedoch mangels Zulassung nur nach Genehmigung durch die zuständige Landesveterinärbehörde importiert und angewendet werden.

In wertvollen Zuchtbeständen sollte darüber hinaus evtl. einige Tage vor dem Einwirken von im Voraus bekannten Streßfaktoren wie Neukauf, Umsetzen, Transport etc. eine prophylaktische Gabe von Paramunitätsinducern in Erwägung gezogen werden.

Wirksame Bekämpfungserfolge versprechen sich viele Autoren durch die bessere Erkennung und Eliminierung von PsHV-Carriern mittels neuer Untersuchungsmethoden (TOMASZEWSKI et al., 2001) und die Entwicklung eines kommerziellen polyvalenten Impfstoffes, der gegen alle derzeit vorkommenden PsHV-Serotypen schützt (KALETA, 1990; MAGNINO et al., 1996; GRAVENDYCK et al., 1996).

2.2 Erregereigenschaften

2.2.1 Allgemeines

Der Name der Herpesviren leitet sich vom griechischen Wort *herpein* (kriechen) ab und weist auf die kriechende Ausbreitung des von Herpes-simplex-Viren verursachten Hautausschlags hin (ROIZMAN, 1980; LIEBERMANN, 1992; MODROW und FALKE, 1997).

Herpesvirusinfektionen treten weltweit bei Vertebraten und Avertebraten auf. Unter natürlichen Bedingungen haben Herpesviren meist ein sehr enges Wirtsspektrum und sind vorwiegend auf die jeweilige Spezies beschränkt. Obwohl die verursachten Krankheitssymptome stark variieren, gleichen sich bei allen Vertretern dieser Virusfamilie die Partikelmorphologie und die biologischen Eigenschaften.

Die Vermehrung des linearen, unsegmentierten, doppelsträngigen DNA-Genoms erfolgt im Zellkern, wo auch die Morphogenese stattfindet (LIEBERMANN, 1992).

Alle Herpesviren kodieren für mehrere Enzyme, die im Nukleinsäurestoffwechsel (z.B. Thymidinkinase, dUTPase, Ribonukleotid Reduktase etc.) und bei der Genomreplikation (z.B. DNA-Polymerase, Helikase) aktiv sind.

Die Wirtszellen, in denen sich Herpesviren lytisch vermehren, sterben bei der Produktion von Nachkommenviren ab, denn die Virusfreisetzung ist immer mit Zellzerstörung verbunden. Charakteristisch für die Infektion einer Zelle mit Herpesviren ist hierbei die sog. Marginalisierung, d.h. Ansammlung des nukleären Chromatins im Randbereich des Wirtszellkerns (ROIZMAN, 1980; LIEBERMANN, 1992; ROIZMAN, 1996; WUTZLER, 1996; MODROW und FALKE, 1997).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist die Fähigkeit, nach der Erstinfektion über Monate, Jahre oder sogar lebenslang latent im Organismus zu verbleiben. Dabei liegt das virale Genom in zirkulärer Form in der Wirtszelle vor. In diesem Zustand ist die Produktion von infektiösen Partikeln unterbunden und die infizierten Zellen überleben. Das Virus kann jedoch jederzeit z.B. durch Stress, Hormone, Zytostatika und andere äußere und innere Einflüsse aus dem Stadium der Latenz zum lytischen Infektionszyklus reaktiviert werden, – ein Vorgang, der sich durch das Wiederauftreten des gleichen oder eines der Primärinfektion ähnlichen Erkrankungsbildes äußern kann (s. auch unter Punkt 2.1.5 und 2.1.6).

Neutralisierende Antikörper, welche in der Regel ca. 14 Tage nach einer Infektion mit Herpesviren auftreten, sind gegen die Glykoproteine der Virushülle gerichtet. Dennoch haben sie keinen Einfluß auf Latenz bzw. Reaktivierung und verhindern auch nicht die Infektion, sondern weitgehend die klinische Erkrankung. Bei der Immunantwort spielt vor allem die zytotoxische T-Zell-Antwort eine wichtige Rolle (WUTZLER, 1996).

Einzelne Vertreter der Familie Herpesviridae sind in ihren natürlichen Wirten und in Versuchstieren onkogen (CALNEK, 1997; MODROW und FALKE, 1997; STÜNZI und WEISS, 1990).

2.2.2 Einteilung und charakteristische Vertreter

Die Vertreter der Familie Herpesviridae lassen sich aufgrund ihrer Pathogenität, der Zelltypen, die sie infizieren und ihrer Vermehrungseigenschaften in die drei Unterfamilien Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae und innerhalb diesen in verschiedene Genera einordnen (ROIZMAN et al., 1995):

Der Subfamilie *Alphaherpesvirinae* zugehörige Herpesviren weisen ein breites Wirtsspektrum auf, haben einen verhältnismäßig kurzen Replikationszyklus und vermehren sich in zahlreichen Zellkulturen. Die Infektion breitet sich schnell von Zelle zu Zelle aus und infizierte Zellen werden nach kurzer Zeit zerstört. In Zellkulturen entwickelt sich daher schnell ein lytischer cpE. Alphaherpesvirinae persistieren in sensorischen Ganglienzellen, wohin sie nach Aszendierung ausgehend von einer Primärinfektion gelangen (z.B. in das Trigeminalganglion nach oraler Infektion). Das natürliche Wirtsspektrum ist relativ groß. Innerhalb der Subfamilie werden zur Zeit die beiden Genera *Simplexvirus* (humanes Herpesvirus 1 und 2, bovines Herpesvirus 2 u.a.) und *Varicellovirus* mit dem bovines Herpesvirus 1, dem Virus der Aujetzky'schen Krankheit, dem Varicella-Zoster-Virus und den equinen Herpesviren 1 und 4 unterschieden. Das PsHV ist als bisher einziges Herpesvirus aus Zier- und Wildvögeln der Unterfamilie Alphaherpesvirinae zugeordnet worden (MINSON et al., 2000).

Charakteristisch für Mitglieder der Unterfamilie *Betaherpesvirinae* sind ein langsamer Replikationszyklus und damit einhergehend eine nur langsame Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle, wobei sich der typische cpE in infizierten Zellkulturen in Form von Zytomegalie zeigt. Das Wirtsspektrum in vivo und in vitro ist sehr eng. Eine latente Infektion manifestiert sich vor allem in Zellen des lymphoretikulären Gewebes, in Drüsen und den Nieren. Die Subfamilie Betaherpesvirinae umfasst die Genera

Cytomegalo- (humanes Zytomegalievirus), *Muromegalo-* (Murines Herpesvirus) und *Roseolovirus* (humanes Herpesvirus 6).

Die Unterfamilie ***Gammaherpesvirinae*** beinhaltet Viren, die lymphoproliferative Infektionen auslösen und bis auf wenige Ausnahmen entweder für B- oder für T-Lymphozyten spezifisch sind. Latentes Virus wird häufig in lymphoidem Gewebe nachgewiesen. Bislang enthält die Unterfamilie die beiden Genera *Lymphocrypto-* (humanes Herpesvirus 4, Eppstein-Barr-Virus) und *Rhadinovirus* (Atelines Herpesvirus 2 und 3).

Insgesamt umfasst die Familie Herpesviridae bisher 119 bei warm- und kaltblütigen Wirbeltieren vorkommende Virusspezies, wobei parallel zu den oben aufgeführten, bereits zu Genera zusammengefassten Arten auch eine Vielzahl an Spezies existiert, die zunächst nur vorläufig in eine Subfamilie und/oder ein Genus eingeteilt wurden. Daneben gibt es auch einige Herpesviren, welche bisher nur der Familie Herpesviridae zugeordnet wurden (LIEBERMANN, 1992; ROIZMAN, 1996; ROIZMAN und SEARS, 1996; WUTZLER, 1996; MODROW und FALKE, 1997; MINSON et al. 2000).

2.2.3 Morphologie

Herpesviren besitzen eine kubische Symmetrie. Im Inneren des ca. 120- 200 nm großen behüllten Virions findet man einen elektronendichten Innenkörper, das sog. Protein-Core, welches in Wechselwirkung mit dem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom vorliegt. Das Core ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, das aus mehreren Virusstrukturproteinen besteht und 100-120 nm im Durchmesser misst. Es ist mit 162 ikosaedrisch angeordneten Kapsomeren besetzt (150 Hexameren und 12 Pentameren). Die Kapsomeren besitzen einen polygonalen Querschnitt und sind teilweise hohl. Sie umgeben das Kapsid in facettenartiger radiärer Anordnung. Das Kapsid ist umhüllt, wobei die Hülle von der inneren Kernmembran abgeleitet ist und an ihrer Oberfläche stachelartige Glykoproteinfortsätze trägt, die an der Reaktion mit neutralisierenden Antikörpern beteiligt sind. Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran befindet sich

das polypeptidhaltige Tegument, das verschiedene regulatorisch aktive Proteine enthält (LIEBERMANN, 1992; ROIZMAN et al, 1995; ROIZMAN und SEARS, 1996; MODROW und FALKE, 1997; LIESS, 1997, MINSON et al., 2000).

2.2.4 Genom und Genomaufbau

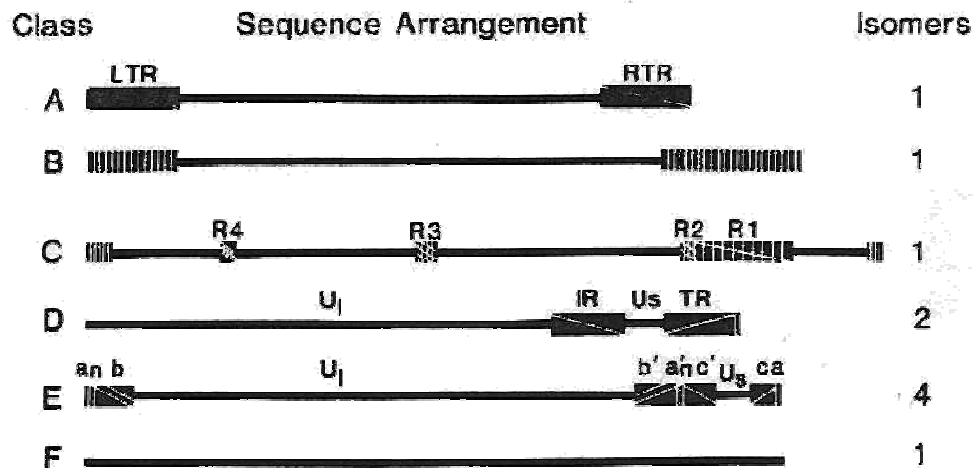
Das Genom der Herpesviren liegt im Virion als lineare, doppelsträngige DNA vor und hat eine Größe von 120.000 bis 230.000 Basenpaaren (bp) mit einem Guanin- und Cytosinegehalt (G+C) von 32 bis 75 %. Bei allen Virustypen findet man einmalig vorkommende (*unique*) und sich wiederholende (*repeat*) Sequenzabschnitte, die bei den Vertretern der jeweiligen Genera in unterschiedlichen Mustern angeordnet sind (vgl. Abb. 1 und 2). Man vermutet, dass die beiden Genomenden im Virion räumlich eng beieinander liegen. Bei den aus Sequenzwiederholungen bestehenden Genomregionen unterscheidet man je nach ihrer Lokalisation an den Genomenden oder innerhalb des Genoms zwischen *terminal repeat* (TR) und *internal repeat* (IR) Sequenzabschnitten. Abhängig von der Anzahl an darin enthaltenen offenen Leserahmen (ORF) werden die U- sowie die IR- und die TR-Abschnitte weiter in lange (L) und kurze (S) Regionen unterteilt (ROIZMAN und SEARS, 1996; MODROW und FALKE, 1997; Abb. 2 verdeutlicht diese Nomenklatur am Beispiel des Herpes-simplex-Virus).

Bei der Infektion einer Zelle wird die lineare DNA in einen zirkulären Strang überführt, der dann als sog. Episom im Plasma des Zellkerns vorliegt. Die Anzahl der im Genom enthaltenen ORFs reicht von ca. 70 bis über 200, wodurch beide Stränge für eine entsprechende Anzahl an Genprodukten kodieren. Teilweise werden diese unter Verwendung unterschiedlicher Leseraster von miteinander überlappenden Leserahmen exprimiert. Die Expression jedes Gens wird von einem spezifischen vorgelagerten Promotor kontrolliert, der Erkennungsstellen für die zelluläre RNA-Polymerase II besitzt. Zusätzlich verfügen die Promotorbereiche über Bindungsstellen für zelluläre und virale Transaktivatoren, die bestimmen, zu welchem Zeitpunkt des Infektionszyklus das entsprechende Gen aktiviert und exprimiert wird. Zu den von allen Herpesviren kodierten Proteinen gehören die DNA-Polymerase, DNA-bindende Proteine sowie eine Protease. Zusätzliche Proteine mit enzymatischer Aktivität, von denen bekannt ist, dass

sie zumindest von einigen Herpesvirusgenomen kodiert werden, sind die Thymidin-Kinase, dUTPase, Ribonukleotid-Reduktase, Uracil-Glycosylase sowie mehrere Proteinkinasen. RNA-Polymerasen werden nicht von der viralen DNA kodiert (ROIZMAN, 1996; WUTZLER, 1996; MODROW und FALKE, 1997).

Das Genom eines Herpesvirus lässt sich nach ROIZMAN et al. (1992) abhängig von der Anordnung der *terminal* und *internal repeat* Sequenzen in eine von 6 Gruppen (A bis F) einteilen:

Abb. 1: Genomaufbau der Herpesviren (nach ROIZMAN et al., 1992)

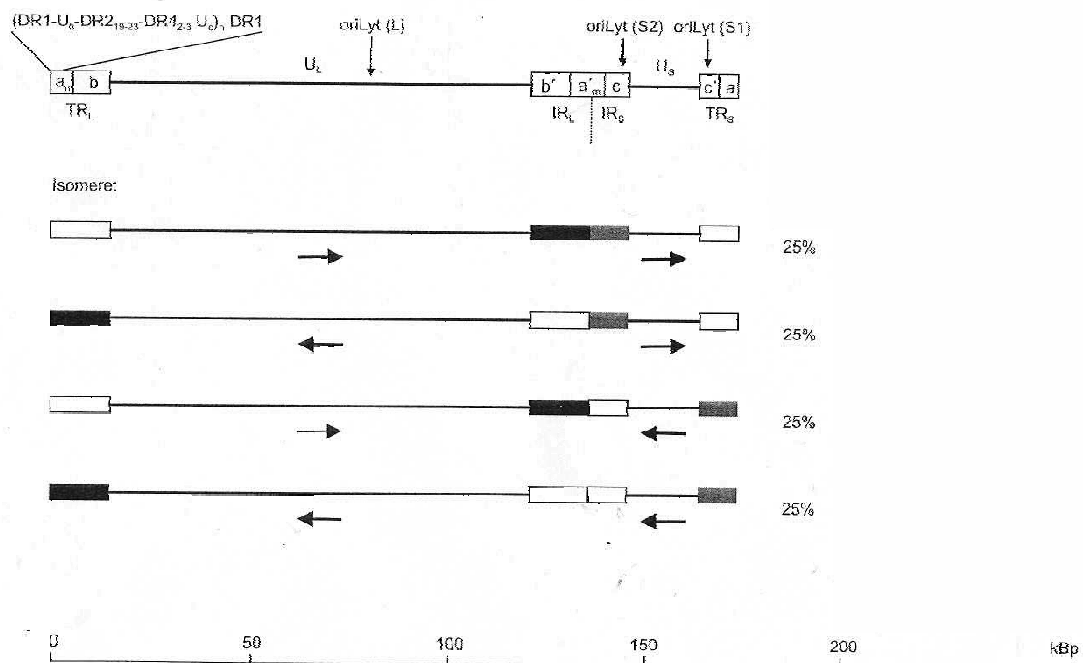


Legende zur Abb. 1:

Die Genomregionen, die aus Sequenzwiederholungen (R) bestehen, sind als rechteckige Balken dargestellt. Sie werden je nach Gruppenzugehörigkeit und damit Anordnung als Left und Right Terminal Repeats (LTR bzw. RTR) in der Gruppe A, als repeats R 1 bis 4 bei den im Genominneren befindlichen Sequenzen der Gruppe C und als internal und terminal repeats IR und TR bei den Innen- und Endsequenzen der Gruppe D bezeichnet. Die einmalig vorkommenden Sequenzabschnitte (U) sind als Striche repräsentiert. Die Lage der terminalen und internen Wiederholungseinheiten und ihre Orientierung zueinander werden in der Gruppe E mit Kleinbuchstaben bezeichnet; a und a' stellen somit beispielsweise invertiert zueinander vorliegende, in n Kopien vorkommende, identische Basenfolgen dar). Während der Infektion

und Replikation können durch intramolekulare Rekombination dieser identischen, invertierten Wiederholungseinheiten vier isomere Genomformen entstehen, in denen die U_L - und U_S -Regionen unterschiedlich zueinander angeordnet sind. Die Anzahl an möglichen isomeren Formen innerhalb der einzelnen Gruppen ist jeweils am Zeilenende aufgeführt. In der Gruppe F existieren keine terminal repeat Sequenzen an den Genomenden.

Abb. 2: Genomorganisation des Herpes-Simplex-Virus (HSV-1) und mögliche isomere Formen (nach MODROW und FALKE, 1997)



Legende zur Abb. 2:

Das Genom des HSV-1 ist der in Abb. 1 von ROIZMAN et al. (1992) beschriebenen Gruppe E zugehörig. Die aus Sequenzwiederholungen bestehenden Regionen sind als rechteckige Balken dargestellt. Die einmalig vorkommenden Sequenzabschnitte (U) sind als Striche repräsentiert. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, setzt sich das HSV-1 aus zwei Untereinheiten, einer langen (U_L) und einer kurzen (U_S) Region zusammen, die von invertierten, jeweils zueinander homologen Abschnitten begrenzt werden. Zusätzlich sind in der Abbildung die Ausgangspunkte der Genomreplikation nach dem rolling circle-Mechanismus eingezeichnet, die während des

lytischen Replikationszyklus beim HSV-1 aktiv sind: oriL, oriS1 und oriS2. Die Lage der terminalen und internen Wiederholungseinheiten und ihre Orientierung zueinander werden mit Kleinbuchstaben bezeichnet; a und a' stellen als Beispiel invertiert zueinander positionierte, in n Kopien vorkommende identische Basenfolgen dar. Durch die freie Invertierbarkeit der _L- und _S-Einheit treten bei der Replikation vier isomere Genomformen auf, deren Bedeutung noch unklar ist. Die am Zeilenende angegebene Prozentzahl gibt jeweils die Wahrscheinlichkeit an, in der jede der vier isomeren Formen in den Virionen gefunden wird. Wildtypvirusstämme bestehen demnach aus gleichen Mengen aller vier Genomformen.

2.2.5 Virusreplikation

2.2.5.1 Lytischer Infektionszyklus

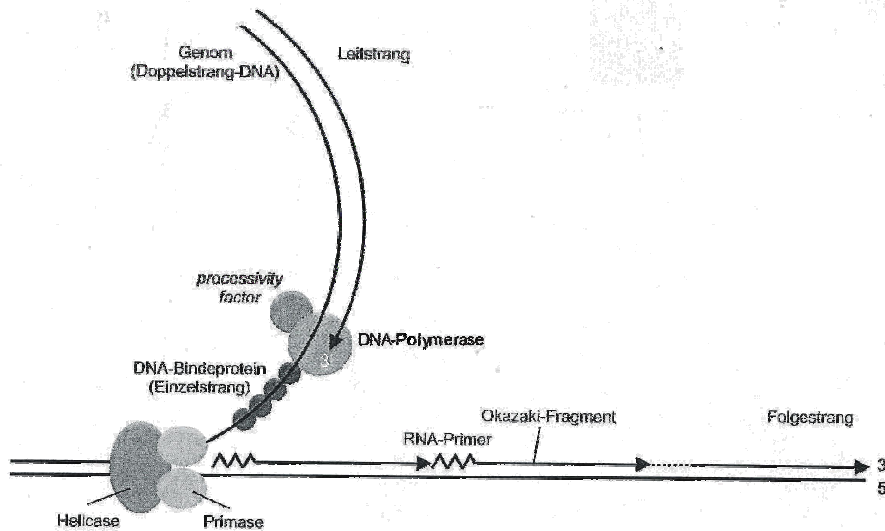
Herpesviren adsorbieren durch ihre Oberflächenproteine an bestimmte Rezeptoren der Zelloberfläche. Danach verschmelzen die Membranen der Viruspartikel und der Zelle miteinander, und das Kapsid mit dem Tegument gelangt in das Zytoplasma. Hier lagern sich die Kapside an Mikrotubuli an und werden zu den Kernporen transportiert, durch die das Genom in den Innenraum des Zellkernes, das sogenannte Nukleoplasma, entlassen wird. Dorthin gelangen auch die viralen Proteine. Das DNA-Genom zirkularisiert und liegt dann als Episom im Kernplasma vor (siehe auch Kapitel 2.2.4). Neben dieser direkten Virus-Zelloberflächen-Interaktion bei der Infektion von Zellen können Herpesviren auch in Zellen gelangen, welche keine Rezeptoren zur Bindung von freien Viruspartikeln auf ihrer Zelloberfläche besitzen. Die Membranen der infizierten Zellen können mit denen von nichtinfizierten verschmelzen und somit eine Membranfusion einleiten. Auf diese Weise werden die Kapside auf indirektem Weg von Zelle zu Zelle weitergegeben, so dass sich die Viren auch unabhängig von der Anwesenheit infektiöser Partikel im Organismus ausbreiten können.

Die Expression des viralen Genoms erfolgt kaskadenartig in drei Phasen: Zuerst werden die „immediate early-Proteine“ – IE synthetisiert, welche wichtige Regulatoren in der Zelle sind. Durch ein virales Strukturprotein wird die Expression der IE-Gene aktiviert

(O'HARE, 1993). Die Transkription wird von der zellulären RNA-Polymerase II übernommen (SPEAR und ROIZMAN, 1980). Nach ihrer Synthese werden die IE-Proteine in den Kern transportiert und regulieren dort durch Aktivierung der Promotoren die folgende Translation und Transkription der „delayed early“- (E)- und der „delayed oder late -Proteine“ – (L). Die Synthese der E-Proteine erreicht 5-8 Stunden post infectionem den Höhepunkt. Zu ihnen gehören eine große Anzahl an nukleinsäurebindenden Polypeptiden und Enzymen, die am DNA-Metabolismus beteiligt und für die Replikation des Virusgenoms erforderlich sind, wie z.B. eine DNA-Polymerase, alkalische Exonuklease und Thymidinkinase. Wenn E-Proteine in ausreichender Menge gebildet sind, beginnt die Synthese der Nachkommen-DNA.

Während des lytischen Replikationszyklus erfolgt die Replikation der Virus-DNA nach dem sog. „rolling circle-Mechanismus“. Im Genom findet man Sequenzelemente, die als Ursprungsorte für die DNA-Synthese dienen (siehe auch Abb. 2). In Abb. 3 sind die Proteine dargestellt, die hierbei an der Genomreplikation beteiligt sind. An den Replikationsursprung binden sich die Ori_{LYT} bindenden Proteine, welche ermöglichen, dass sich der Komplex der viralen DNA-Polymerase/Helikase/Primase daran anlagert. Ein DNA-Strang wird geschnitten, so dass ein 3'-OH- und ein 5'-Phosphat-Ende entsteht, wobei das 3'-OH-Ende als Primer für die Polymerisationsreaktion dient, so dass die Nukleotide kontinuierlich unter Verwendung des geschlossenen DNA-Stranges als Matrize an das 3'-OH-Ende ansynthetisiert werden. Dabei wird das 5'-Ende fortlaufend vom Matrizenstrang gelöst. Dessen einzelsträngige DNA wird durch Bildung von kurzen RNA-Primern und Okazaki-Elementen zum Doppelstrang ergänzt, wodurch sich ein neuer DNA-Strang bildet, der vielfache Segmente des Virusgenoms enthält. Gleichzeitig mit der DNA-Synthese werden die späten Virusproteine (Envelope-Glykoproteine, nukleokapsid- und tegumentassoziierte Proteine) exprimiert. Diese viralen Strukturproteine werden bis zu ca. 15 Stunden nach der Infektion in verschiedenen zellulären Organellen gebildet und nach ihrem Zusammenbau zu Partikelvorläufern und der Reifung zu infektiösen Viruspartikeln zur Zelloberfläche transportiert und dort freigesetzt. Bei Vertretern der Subfamilie Alphaherpesvirinae sind bereits 15-20 Stunden nach der Infektion neu synthetisierte Virionen nachweisbar.

Abb. 3: Darstellung der nach dem rolling circle-Mechanismus bei der lytischen Replikation der Herpesviren beteiligten Virusproteine (nach MODROW und FALKE, 1997)



2.2.5.2 Latenter Infektionszyklus

In vivo führt eine Herpesvirusinfektion nicht zwangsläufig zum Zelltod. Bei Alphaherpesvirinae kann es z.B. in Neuronen zur Etablierung einer latenten Infektion kommen, nachdem das Virus als Nukleokapsid das sensorische Ganglion erreicht hat. Der Transport dorthin erfolgt auf retrogradem, intraaxonalem Wege, da die primäre Replikation des Virus an der Eintrittspforte (Schleimhäute, Magen-Darm- oder Respirationstrakt) in den meisten Fällen in einer Infektion sensorischer Nervenendigungen endet (ROIZMAN und SEARS, 1992).

Während der Latenz liegt die Virus-DNA als zirkuläres, extrachromosomales Episom in unterschiedlicher Kopienzahl im Kernplasma der Wirtszelle während der gesamten Lebenszeit des Individuums vor. Das virale Genom wird direkt durch zelluläre

Transkriptionsfaktoren reguliert. Es wird parallel mit dem Zellgenom durch die zelluläre DNA-Polymerase vermehrt und an die Nachkommenzellen weitergegeben, wobei in dieser Phase die Produktion infektiöser Virionen durch verschiedenste Mechanismen unterdrückt wird (MODROW und FALKE, 1997). In situ-Hybridisierungsversuche zeigten, daß IE-mRNA und deren zugehörige Proteine im Gegensatz zur lytischen Infektion nicht exprimiert werden. Es konnten jedoch sog. „latency associated transcripts“ (LAT) nachgewiesen werden, über deren mögliche Funktion bei der Reaktivierung allerdings noch keine Klarheit herrscht (LACHMANN, 1990). Die molekularen Vorgänge und Regulationsprozesse bei der Etablierung und der Aufrechterhaltung der Latenz sowie bei der erneuten Reaktivierung zur lytischen Replikation sind noch weitestgehend unverstanden.

2.3 Besonderheiten des PsHV

2.3.1 Chemische und biologische Eigenschaften

Für eine detaillierte Beschreibung der chemischen und biologischen Eigenschaften des PsHV wird auf die entsprechenden Kapitel in den Dissertationsschriften von SPENKOCH-PIPER (1993), WAGNER (1993) und TRITT (1995) verwiesen.

2.3.2 Serologische Eigenschaften

Bis zum Ende der achtziger Jahre galt der Erreger der PPD als antigenetisch einheitlich. In den letzten 15 Jahren wurden jedoch mit serologischen Methoden (Kreuzneutralisationstests, Plaque-Reduktionstests, indirekte Immunfluoreszenz, Peroxidase-Antiperoxidase-Technik) unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern deutliche antigene Unterschiede zwischen verschiedenen PsHV- Isolaten nachgewiesen (KALETA et al., 1980; KRAUTWALD et al., 1988; SPENKOCH-PIPER, 1993; TARRES et al., 1994; ESKENS et al., 1994; TRITT, 1995; GRAVENDYCK et al., 1996). Umfangreiche Untersuchungen von SPENKOCH-PIPER (1993) an 26 verschiedenen Isolaten aus Papageien mit PPD bestätigten die serologische

Heterogenität innerhalb der PsHV. Aufgrund der dabei erhaltenen Daten konnten sämtliche untersuchten Isolate einer von drei serologischen Gruppen zugeordnet werden. TRITT (1995) und GRAVENDYCK et al. (1996) schließlich konnten mittels serologischer Kreuzneutralisationstests unter Verwendung der Clusteranalyse fünf PsHV-Subtypen unterscheiden:

Tabelle 1: Bisher etablierte serologische Gruppen des PsHV mit jeweils repräsentativen „Referenzstämmen“

PsHV-Serogruppe	Referenzstamm
PsHV-1	KS 144/79
PsHV-2	6840/87
PsHV-3	3115/88
PsHV-4	1483/92
PsHV-5	8326/87

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Virusisolate

3.1.1.1 Neue Virusisolate

Die Mehrzahl der in Tabelle 2 aufgelisteten 11 PsHV-Isolate wurde in der Klinik für Vögel, Reptilien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen aus den Organen gestorbener und zur Sektion eingesandter Papageien im Rahmen der virologischen Diagnostik im Zeitraum von 1997 bis 2002 auf HEF-Kulturen isoliert. Bei dem Isolat 279/00 handelt es sich im Unterschied zu allen anderen Isolaten um ein Virus, welches aus dem Gewebematerial eines Kloakenpapilloms isoliert wurde (Johns et al., 2002).

Die aufgelisteten Virusisolate werden als "neu" bezeichnet, weil bei ihnen nach Feststellung der Herpesvirusidentität bisher keine weitere Charakterisierung im Sinne einer Sero- oder Genotypisierung durchgeführt wurde. Jede Zeile in der Tabelle repräsentiert einen eigenständigen Krankheitsausbruch; dementsprechend sind Virusisolate, die während eines Seuchenzuges aus verschiedenen Tieren isoliert worden sind, in einer Zeile zusammengefasst. Teilweise stammen die Isolate jedoch aus Beständen, in denen bereits wiederholt zeitlich begrenzte PPD-Endemien aufgetreten sind, d.h. es handelt sich hierbei um jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem selben Bestand isolierte Herpesviren.

In der letzten Spalte der Tabelle 2 sind die Befunde, die bei den im Anschluss an die pathologisch-anatomische Untersuchung vorgenommenen weiterführenden Untersuchungen festgestellt wurden, aufgelistet. Bei allen zur Feststellung der Todesursache an die o. g. Klinik eingesandten Vögeln wurden neben der virologischen auch mikrobiologische, parasitologische und ggf. histologische Untersuchungen sowie Untersuchungen auf Chlamydien durchgeführt.

Diagnostisch wurden dabei folgende Organe untersucht:

Bakteriologische Untersuchung (BU): Lunge (Lu), Darm (Da), Niere (Ni), Herz (He),
Milz (Mi) und Leber (Le)

Mykologische Untersuchung (Myk): Kropf (Kr), Muskelmagen (Mm), Drüsenmagen
(Dm), Luftsack (Ls) und Lunge (Lu)

Virologische Untersuchung (Viro): Herz (He), Leber (Le), Milz (Mi), Darm (Da),
Niere und Gehirn (Hi)

Parasitologische Untersuchung (PU): Darminhalt

Bei den Organen Darm und Gehirn wurden Teile des Ileums bzw. Stammhirns zur
Untersuchung entnommen.

Zusätzlich wurden bei jedem Sektionstier die Organe Milz (Mi) und Leber (Le) sowohl
mittels direkter Stamp-Färbung (STAMP et al., 1950) von Organabklatschpräparaten als
auch durch Anzüchtung in Buffalo-Green-Monkey (BGM)-Zellkulturen mit
anschließender Immunfluoreszenz auf *Chlamydophila psittaci* (Chlam.) untersucht
(ARENS und WEINGARTEN, 1981).

Tabelle 2: Bezeichnung, Herkunft sowie Untersuchungsbefunde der 14 neuen PsHV-Isolate

Tagebuch-Nr./ Jahr d. Isolierung	Spezies	Bestand und Haltungsform	Pathologisch-anatomische Befunde	Befunde weiterführender Untersuchungen
3112/97	keine Angaben in den Tagebüchern gefunden	Bestand A: Spanische Sammelstelle zum Import von Wildfängen nach Europa; Gruppenhaltung, Innenvolieren	keine Angaben in den Tagebüchern gefunden	keine Angaben in den Tagebüchern gefunden
2753/98	Taubenhalsamazone (<i>A. vinacea</i>)	Bestand B: Privater Psittaziden-Zuchtbestand; Gruppenhaltung, Voliere	Ernährungszustand (EZ) gut, massive Leber-Nieren- und Milzschwellung, Darminhalt wässrig	BU: Le und He <i>Alpha-Streptokokken</i> , <i>Coliforme Keime</i> ; Myk.: Lu, Ls <i>Aspergillus fumigatus</i> Chlam.u. PU: neg.
862/98	Soldatenara (<i>A. militaris militaris</i>)	Bestand C: Zoologischer Garten in Portugal; Gruppenhaltung, Innen- und Außenvolieren	EZ sehr gut, Leber und Milz stark geschwollen, schaumig-weißer Inhalt im Kropf	BU: neg. Myk.: neg. Chlam. u. PU: neg.
564/99	Gelbscheitelamazone (<i>A. ochrocephala ochrocephala</i>)	Bestand A: Siehe 3112/97	Stressmarken im Gefieder, EZ mäßig bis schlecht, Ikterus, Leber geschwollen mit herdförmigen nekrotischen Veränderungen	BU: Le, Ni, Da <i>Coliforme Keime</i> Myk.: neg. Chlam.u. PU: neg.
2009/99	Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>)	Bestand B: Siehe 2753/98	EZ gut, Stressmarken im Gefieder, Ikterus, Nekrosen in Milz und Leber	BU: neg. Myk.: Lu und Ls: <i>Aspergillus fumigatus</i> Chlam.u. PU: neg.
2490/00	Kubaamazone (<i>A. leucocephala leucocephala</i>)	Bestand B: siehe 2753/98	Milz- und Leberschwellung	BU: He, Le, Mi: <i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus ssp.</i> Myk. : neg. Chlam.u. PU: neg.

Tagebuch-Nr./ Jahr d. Isolierung	Spezies	Bestand und Haltungform	Pathologisch-anatomische Befunde	Befunde weiterführender Untersuchungen
279/00	Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>)	Bestand D: Privattier, Einzelhaltung in der Wohnung	Entwicklung eines Kloakenpapilloms	nicht durchgeführt
180/01, 181/01	Mönchssittich (<i>Myiopsitta monachus</i>); Nymphensittich (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	Bestand E: Privater Zuchtbestand, ausschließlich Sittiche, Gruppenhaltung	Massive Leber- Milz- und Nierenschwellung, aufgrund von starker Autolyse makroskopisch nur schwer beurteilbar	BU: He, Le, Ni: <i>Staphylococcus ssp.</i> Myk: Lu, Ls, Da: <i>Candida ssp.</i>
670/01; 663/01; 661/01	Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>) Rosellasittich (<i>Platycercus eximius eximius</i>); Graupapagei (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>)	Bestand F: Privater Zuchtbestand Gruppenhaltung in Voliere	670/01: EZ gut, Leber- und Milznekrosen, gelbflüssiger Darminhalt; 663/01: EZ gut, Milz- und Leberschwellung, schleimig-dünner Magen- und Darminhalt 661/01: EZ gut, abdominaler Luftsack getrübt, Leber gelblich und brüchig mit nekrotischen Veränderungen	670/01: BU: Mi, Ni <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus ssp.</i> Myk.: Lu: <i>Aspergillus ssp.</i> Chlam. u. PU: neg. 663/01 : BU: Le, Ni und He Lactobazillen, <i>Staphylococcus ssp.</i> Myk. : neg. Chlam. u. PU: neg. 661/01 : BU: Le und Ni Lactobazillen, Staphylokokken Myk.: neg. Chlam. u. PU: neg.
54/02	Orangenhauben-Kakadu (<i>C. sulphurea citrinocristata</i>)	Bestand G: Private Zuchtanlage, Gruppenhaltung Voliere, insg. ca. 400 Vögel im Bestand	Nicht durchgeführt, da lediglich Einsendung von Organmaterial (Leber) zur virologischen US	nicht durchgeführt
131/02	Gelbschulteramazone (<i>A. barbadensis barbadensis</i>)	Bestand H: Keine Angaben zur Haltungform	EZ gut, Lungen- und Luftsackmykose, grün-gelblicher dünnflüssiger Darminhalt, Lebernekrosen	BU: Da, Le, Mi: <i>coliforme Keime</i> Myk.: Mm, Dm, Da: <i>Candida ssp.</i> Chlam. u. PU: neg.

3.1.1.2 Sonstige untersuchte Virusisolate

Die in Tabelle 4 aufgelisteten PsHV-Isolate wurden im Zeitraum von 1987 bis 1996 im Rahmen der virologischen Diagnostik im Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen auf HEF-Kulturen isoliert und wie unter Punkt 3.2.2.3 beschrieben als Herpesviren identifiziert. Einige Isolate aus den Jahren 1987 bis 1989 wurden im Rahmen der Dissertationen von SPENKOCH-PIPER (1993) und TRITT (1995) bereits serologisch klassifiziert. 3 Isolate aus dem Jahr 1995 wurden von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) serologisch sowie durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 3 jeweils bei den betreffenden Isolaten aufgeführt. Detaillierte Angaben zu Herkunft, Anamnese, Klinik, pathologisch-anatomischen sowie weiterführenden mikrobiologischen Untersuchungen sind in den Dissertationsschriften o. g. Autorinnen zu finden.

Tabelle 3: Isolatbezeichnung, Psittazidenspezies und ggf. Serogruppe und/oder Restriktionsgruppe nach SPENKOCH-PIPER (1993), TRITT (1995) bzw. SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) der 31 sonstigen untersuchten Virusisolate

Tagebuch-Nr./ Jahr d. Isolierung	Serogruppe ¹ bzw. Restriktions- gruppe ²	Spezies
6090/82		Rosakakadu (<i>E. roseicapillus roseicapillus</i>)
1639/87		Graupapagei (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>)
1674/87		Glatzkopfpapagei (<i>Pionus senilis</i>)
6733/87		Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>);
6896/87		Graupapagei (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>);
6908/87		Timneh-Graupapagei (<i>Psittacus erithacus timneh</i>)
5376/88		Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>)
6058/89	1 ¹	Graupapagei (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>)

Tagebuch-Nr./ Jahr d. Isolierung	Serogruppe¹ bzw. Restriktions- gruppe²	Spezies
7077/89	1 ¹	Panamaamazone (<i>A. ochrocephala panamensis</i>)
7129/89	1 ¹	Graupapagei (<i>Psittacus erithacus erithacus</i>)
1979/90		Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>)
2864/90		Gelbwangenamazone (<i>A. autumnalis autumnalis</i>)
3042/90	1 ¹	Blaustirnamazone (<i>Amazona aestiva aestiva</i>)
5174/90		Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>)
5092/91		Gelbbugamazone (<i>A. aestiva xanthopteryx</i>)
1613/92		Venezuelaamazone (<i>A. amazonica</i>)
2609/92	1 ¹	Taubenhalsamazone (<i>A. vinacea</i>)
2384/92		Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>)
1587/92		Gelbnackenamazone (<i>A. ochrocephala auropalliata</i>)
1071/93		Gelbscheitelamazone (<i>A. ochrocephala ochrocephala</i>)
1606/94		Molukkenkakadu (<i>C. moluccensis</i>)
2335/94		Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>)
4739/94		Rosakakadu (<i>Eolophus roseicapillus roseicapillus</i>)
5139/94		Gelbscheitelamazone (<i>A. ochrocephala ochrocephala</i>)
5192/94		Blaustirnamazone (<i>A. aestiva aestiva</i>)
1257/95		Scharlachkopfpapagei (<i>Pionopsitta pileata</i>)
1277/95		Orangehaubenkakadu (<i>C. sulphurea citrinocristata</i>)
1987/95		Kubaamazone (<i>A. leucocephala leucocephala</i>)
2162/95	1 ¹ ; A2 ²	Gelbscheitelamazone (<i>A. ochrocephala ochrocephala</i>)
2685-20/95	1 ¹ ; A2 ²	Felsensittich (<i>Cyanoliseus patagonus</i>)
4133/95	2 ¹ ; F ²	Amazone (<i>A. ssp.</i>)

Legende zur Tabelle 3:

- ¹: Serogruppe nach SPENKOCH-PIPER (1993) und/oder TRITT (1995). Die zugehörigen PsHV-Isolate wurden von den Autoren bereits untersucht und in die genannten Serogruppen eingeteilt.
- ²: Restriktionsgruppe nach SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999). Die zugehörigen PsHV-Isolate wurden von der Autorin bereits untersucht und in die genannten Restriktionsgruppen eingeteilt
- offene Felder: die zugehörigen PsHV-Isolate wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht.

3.1.1.3 Als „Referenzstämme“ verwendete PsHV-Isolate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der Tabelle 4 aufgeführten Virusstämme bei den zur Differenzierung angewendeten Methoden PCR und Restriktionsenzymanalyse jeweils zum Zwecke eines direkten Vergleichs als Referenzstämme in jedem Versuch mitgeführt und dabei auf die gleiche Weise behandelt wie die zu untersuchenden, in Tabelle 2 und 3 aufgeführten PsHV-Isolate.

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Virusstämme repräsentieren nach SPENKOCCH-PIPER (1993) und GRAVENDYCK et al. (1993) jeweils einen eigenständigen Serotyp (s. auch Tabelle 1). In den Untersuchungen von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) wurde darüber hinaus mittels Spaltung durch Restriktionsendonukleasen die o.g. serologische Einteilung bestätigt.

Des weiteren wurden die 5 Referenzstämme als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen (vgl. Punkt 3.2.2) verwendet, wobei die produzierten polyklonalen Antiseren im Kreuzneutralisationstest und im Western Blot als Referenzseren dienten.

Tabelle 4: Bezeichnung, Psittazidenspezies, Serotyp (nach GRAVENDYCK et al. (1996), Spezies und Quelle der als Referenzstämme verwendeten PsHV-Isolate

Bezeichnung u. Tagebuch-Nr.	Spezies	Serotyp	Quelle
KS 144/79	Amazone (<i>A. aestiva.</i>)	1	Kaleta et al. (1979)
6840/87	Blaustirnamazone (<i>A. a. aestiva</i>)	2	Krautwald et al. (1988)
3115/88	Doppelgelbkopfamazone (<i>A. o. ochrocephala</i>)	3	Klinik f. Vögel, Reptilien u. Fische, Giessen, Diagnostik
1483/90	Große Gelbkopfamazone (<i>A. ochrocephala oratrix</i>)	4	Klinik f. Vögel, Reptilien u. Fische, Giessen, Diagnostik
8326/87	Rotbauchsittich (<i>Pyrrhura rhodogaster</i>)	5	Krautwald et al. (1988)

3.1.1.4 Negativkontrollen

Die in der PCR und im Western Blot eingesetzten Negativkontrollen wurden aus uninfizierten, d.h. mit Zellkulturmedium statt mit Virus inokulierten HEF-Kulturen hergestellt und auf die gleiche Weise behandelt bzw. aufgereinigt wie die Viruszüchtungen.

3.1.2 SPF-Eier und daraus hergestellte Zellkulturen

3.1.2.1 SPF-Hühnereier

Die für die Herstellung von Hühnerembryofibroblasten-Kulturen zur Vermehrung und Titration der verschiedenen PsHV-Isolate verwendeten SPF-Eier wurden von der Firma LOHMANN TIERZUCHT GmbH, Cuxhaven, im Zeitraum von Oktober 2000 bis März 2003 aus den Herden mit den Nummern 582, 583, und 585 geliefert. Es wird das Freisein von den in der Tabelle 5 aufgeführten Erregern bzw. Antikörpern zertifiziert:

Tabelle 5: Erreger und Testmethoden zur Überprüfung des Status der Bruteier liefernden SPF-Tiere

Erreger	Testmethode
Küken-Anämie-Virus (CAV)	ELISA
Aviäre Adenoviren: A) Serotyp 1-12 B) EDS 76-Virus	AGP/SNT/ELISA HAH
Aviäres Encephalomyelitis-Virus (AE)	ELISA
Aviäres Leukosevirus/RSV-Virus	ELISA
Aviäres Nephritis-Virus	FAT
Aviäres Reovirus	ELISA
Hühnerpockenvirus	KU/p.m.
Infektiöse Bronchitis-Virus (IB)	ELISA
Infektiöse Bursitis-Virus (IBD)	AGP
Infektiöse Laryngotracheitis-Virus (ILT)	ELISA
Influenza Typ A-Virus	ELISA
Virus der Marek'schen Krankheit	AGP

Erreger	Testmethode
Mykoplasmosen (<i>M. gallisepticum</i> und <i>M. synoviae</i>)	Aggl./HAH
Virus der Newcastle-Krankheit (ND)	HAH
Reticuloendotheliose-Virus	ELISA
<i>Salmonella pullorum</i>	Aggl.
Andere Salmonellen	BU
Puten-Rhinotracheitis-Virus (TRT)	ELISA

Legende zur Tabelle 6:

HAH	= Hämagglutinations-Hemmungs-Test
AGP	= Agargel-Präzipitations-Test
Aggl.	= Agglutinations-Test
FAT	= Fluoreszenz-Antikörper-Test
SNT	= Serum-Neutralisations-Test
BU	= Bakteriologische Untersuchung
KU	= Klinische Untersuchung
p.m.	= post mortem
ELISA	= Enzyme-linked immunosorbent assay

Nach Anlieferung der Eier wurden diese bis zum Beginn der Bebrütung für 1 bis 7 Tage bei 13-16 °C in einem Klimaschrank der Firma HEREAUS, Osterode, gelagert. Die Bebrütung erfolgte bei 38,0 ± 0,5 °C, 50-70% relativer Luftfeuchte und täglich 6-maliger Wendung in einem vollautomatischen Brutschrank BSS 420 der Firma GRUMBACH, Aßlar.

Tabelle 6: Bezeichnung, Herkunft, Subtyp und homologer Antikörpertiter der in den Neutralisationstests und im Western Blot eingesetzten Antisera

Subtyp	Zur Immunisierung verwendetes PsHv-Isolat	Produzent	Homologer Titer in log₂
PsHv-1	KS 144/79	Kaninchen Nr. 1	8
PsHv-2	6840/87	Kaninchen Nr. 2	6
PsHv-3	3115/88	Kaninchen Nr. 3	7
PsHv-4	1483/92	Kaninchen Nr. 4	6
PsHv-5	8326/87	Kaninchen Nr. 5	8

3.1.4.2 Goat-Anti-Rabbit Immunglobulin- (IgG) Konjugat

Im Western Blot wurde zur Detektion von gebundenem Erstantikörper (=Hyperimmunserum aus Kaninchen, s. auch unter Punkt 3.1.4.1) ein Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG von der Ziege (DIANOVA, Hamburg) eingesetzt (vgl. Punkt 3.2.4.4).

3.1.5 Enzyme

3.1.5.1 Restriktionsendonukleasen

Die für die vergleichenden Untersuchungen verwendeten Restriktionsendonukleasen mit ihren jeweiligen Erkennungssequenzen und Schnittstellen sind in Tabelle 7

aufgelistet. Sämtliche Enzyme wurden bei der Firma New England Biolabs, Frankfurt a. M., bezogen.

Tabelle 7: Erkennungssequenzen und Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz
Eco R1	5'-G AATTC-3'
Bam H1	5'-G GATCC-3'
Hae 3	5'-GG CC-3'
Hind III	5'-A AGCTT-3'
Pst I	5'-CTGCA G-3'
Xho I	5'-C TCGAG-3'
Hpa I	5'-GTT AAC-3'

3.1.5.2 Polymerase

In der PCR wurde die DyNAzyme™ II DNA-Polymerase zur Amplifikation der DNA-Fragmente eingesetzt (Bestandteil des DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kits, Fa. Finnzymes, Espoo, Finnland; rekombiniertes Enzym, isoliert und aufgereinigt aus einem E. coli-Stamm, welcher ein Plasmid mit dem klonierten DyNAzyme DNA Polymerase-Gen von *Thermus brockianus* trägt).

3.1.6 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die in der PCR verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden HPLC-gereinigt von der Firma ARK Scientific, Darmstadt bezogen. Die Primersequenzen sind der

Veröffentlichung von TOMASZEWSKI et al. (2000) entnommen und wurden aus 3 in einen Plasmidvektor klonierten und teilsequenzierten *Hind* III-Restriktionsfragmenten eines PsHV-Isolates ausgewählt (vgl. Tabelle 8). Es handelt sich dabei um die Klone 9 und 11, anhand deren Sequenz die Primerpaare ausgewählt wurden. Zusätzlich wurde aus der Plusstrang-DNA von Klon 23 ein Primerpaar selektiert. Die untersuchten Klone enthalten Teilsequenzen verschiedener offener Leserahmen auf der langen, einmalig vorhandenen Genomregion (Unique long region, U_L) des PsHV. Die in den PsHV-Fragmenten enthaltenen Gensequenzen kodieren für folgende Proteine:

Tabelle 8: Offene Leserahmen innerhalb der sequenzierten PsHV-Fragmente (TOMASZEWSKI et al., 2001)

Klon	NT¹	Korrespondierendes Protein und Funktion
9F (forward sequence)	851	UL19; Hauptcapsidprotein (Capsomer)
9R (reverse sequence)	379	UL 21
11F (forward sequence)	882	UL14; Funktion unbekannt UL15A; Schneiden und Verpacken von viraler DNA in Nukleokapside
11R (reverse sequence)	427	UL9; Ori _{LYT} -bindendes Protein
23F (forward sequence)	1.558	UL17; Schneiden und Verpacken von viraler DNA in Nukleokapside UL16; Glycoprotein, host-range protein

Legende zur Tabelle 8:

¹NT: Anzahl der Nukleotide

Tabelle 9: Primer für die PsHV-PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2000)

Primerpaar	Größe des Amplikons (in bp)	Sequenz
9 Forward (9F)	489	5' TGAGAGGATGTTTCGCACGAGC-3' 5' GGGCTCTTACTTCAACACGATAACC-3'
9 Reverse (9R)	378	5' GCACATGAGAGACTTCACAGGGC-5' 5' TCTAACGCAGGGGAAGCTATACG-3'
11 Forward (11F)	394	5' CAAGTTCAAACCGTCGC-5' 5' TTGCCGCTTCTTCGTGCTC-3'
11 Reverse (11R)	310	5' AATAGGAGCTTTGGGGAGTTGC-3' 5' ACAGCCTTTTCTGGGTGCG-3'
23 Forward (23F)	281	5' TTTGTCCCACACTTCGTC-5' 5' ACTACTTTCGCTTTGGCG-3'

3.1.7 Fertige Reagenziensysteme

DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit (Finnzymes, Espoo, Finnland)

3.1.8 Medien, Reagenzien und Pufferlösungen für die Zellkultur

- **Aqua bidest.**

- **Minimum Essential Medium (MEM) mit Earles'schen Salzen** (EARLE. 1934)

MEM-Earle's Pulver

(JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, USA)	9,69 g
NaHCO ₃ (VWR International, Darmstadt)	2,20 g
Gentamicinsulfat (50 mg/ml)	1,00 ml
(Sigma Aldrich, Taufkirchen)	
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl oder 1N NaOH auf pH 6,9 \square 7,1; Sterilfiltration (0,22 μ m Membranfilter), Aufbewahrung lichtgeschützt bei + 2 bis + 8 °C, Haltbarkeit bis zu 12 Monate.

- **Zellkulturmedium TCM**

Medium 199 Earle (Firma BIOCHROM KG, Berlin)	80,0 ml
Tryptose-Phosphat-Bouillon	
(29,5 g Tryptose-Phosphat ad 1000 ml Aqua bidest.)	100,0 ml
NEA	10,0 ml
Glutaminlösung	
(30 g L-Glutamin ad 1000 ml Aqua bidest.)	8,0 ml
NaHCO ₃ (7,5 %)	15,0 ml
Gentamicinsulfat (50 mg/ml)	
(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	1,0 ml
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 bis 7,4 mit 1 N HCl oder 1 N NaOH, ggf. vor Verwendung erneute Einstellung nötig; lichtgeschützte Aufbewahrung bei + 2 bis + 8 °C.

(NEA: 0,42 g L-Arginin x HCl, 0,24 g L-Cystin, 2,9 g L-Glutamin, 0,21 g L-Histidin x HCl, 0,525 g L-Isoleucin, 0,525 g L-Leucin, 0,73 g L-Lysin, x HCl, 0,15 g Methionin, 1,9 g L-Threonin, 0,08 g L-Tryptophan, 0,36 g L-Tyrosin, 0,47 g L-Valin, 0,15 g Glycin, 0,21 g L-Serin, ad 1000 ml Aqua bidest.)

- **Phosphat-Puffer (PBS; Phosphate buffered Saline)**

Lösung A NaCl (VWR International, Darmstadt)	8,09 g
KCl (VWR International, Darmstadt)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (VWR International, Darmstadt)	0,12 g
Aqua bidest. ad	800,00 ml
Lösung B CaCl ₂ (VWR International, Darmstadt)	0,10 g
Aqua bidest. ad	100,00 ml
Lösung C MgCl ₂ x 6 H ₂ O (VWR International, Darmstadt)	0,10 g
Aqua bidest. ad	100,00 ml

Separate Autoklavierung der Lösungen A, B und C, dann Mischung und Einstellung auf pH 7,0 bis 7,2 mit 5 N HCl; Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Phosphat-Puffer (PBS) ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺**

NaCl (VWR International, Darmstadt)	8,00 g
KCl (VWR International, Darmstadt)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (VWR International, Darmstadt)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ (VWR International, Darmstadt)	1,15 g
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

mit 5 N HCl auf pH 7,0 bis 7,2 eingestellt und autoklaviert; Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Phosphat-Puffer (DPB, Dulbecco's Phosphate Buffer)** (DULBECCO und VOGT, 1954)

NaCl (VWR International, Darmstadt)	8,00 g
KCl (VWR International, Darmstadt)	0,40 g
Na ₂ HPO ₄ (VWR International, Darmstadt)	1,15 g
KH ₂ PO ₄ (VWR International, Darmstadt)	0,20 g
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Sterilfiltration (0,22 µm Membranfilter), Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

- **TV-(Trypsin-Versen-)Lösung**

Trypsin (1:250, Difco, Michigan, USA)	0,50 g
EDTA Na ₂ (Serva, Heidelberg)	0,20 g
D(+)-Glukose-Monohydrat	1,00 g
NaCl (VWR International, Darmstadt)	8,00 g
KCl (VWR International, Darmstadt)	0,40 g
NaHCO ₃ (VWR International, Darmstadt)	0,58 g
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Einstellung auf pH 7,6 mit 1 N NaOH (VWR International, Darmstadt), nach Sterilfiltration (0,22 µm Membranfilter) Aliquotierung in geeignete Volumina und Lagerung bei □20 °C.

- **Trypsin-Melnick 2,5%**

25 g Trypsin 1:250 (Difco, Michigan, USA)
ad 1000 ml mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺.

Die Lösung wird mit NaHCO₃ auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert (0,22 µm Membranfilter) und nach Aliquotierung in geeignete Volumina bei □20 °C gelagert.

- **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution + 0,1% Gentamicin (50 mg/ml))** (HANKS, 1948)

NaCl (VWR International, Darmstadt)	8,00 g
-------------------------------------	--------

KCl (VWR International, Darmstadt)	0,40 g
MgSO ₄	0,10 g
MgCl ₂	0,10 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,15 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Phenolrot	0,02 g
D-Glukose	1,00 g
NaOH, 1 M	0,20 ml
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,11 g
Gentamicinsulfat 50mg/ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	1,00 ml
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Einstellung auf pH 7,2 bis 7,4 mit 1 N NaOH oder 1 N HCl, Sterilfiltration (0,22 µm Membranfilter), Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Foetales Kälberserum (FKS)**

Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

FKS wurde den Zellkulturmedien in einer Konzentration von 5% (Wachstumsmedium bzw. Anzuchtungsmedium) oder 2% (Erhaltungsmedium) zugesetzt. Lagerung bei $\square 20$ °C; nach Anbruch erfolgt die Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C.

Chloroform

pro analysi

(VWR International, Darmstadt)

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

• 5-Jodo-2'-Deoxyuridin (IUDR)

(Sigma, St. Louis, MO, USA)

50 µg/ml

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

• Trypanblau-Lösung

0,25% Trypanblau in 0,15 M NaCl

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

**3.1.9 Lösungen und Reagenzien für die Impfstoffherstellung zur
Immunsierung der Kaninchen****• 0,1 M Trispuffer pH 7,6**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

12,114 g

(VWR International, Darmstadt)

Aqua bidest. ad

900,000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf 7,6, danach Auffüllung mit Aqua bidest. auf 1000 ml. Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

- **Elutionspuffer**

NaCl (VWR International, Darmstadt)	85,000 g
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (VWR International, Darmstadt)	12,114 g
Aqua bidest. ad	950,000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1N HCl auf 7,6; danach Auffüllung mit Aqua dest. auf 1000 ml. Lagerung bei Raumtemperatur.

- **PEG-Lösung**

Polyethylenglycol, Molekulargewicht 6000 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)	500,0 g
0,1M Trispuffer (pH 7,6) ad	1000,0 ml

Autoklavierung, danach Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C in einem luftdicht verschlossenen Gefäß, um eine Eindickung zu vermeiden.

- **Freund'sches Adjuvans, komplett**

(Sigma-Aldrich, Steinheim)

Zellhaltige Suspension, enthält 1 mg/ml hitzeinaktiviertes und getrocknetes *Mycobacterium tuberculosis*, 0,85 ml Paraffinöl und 0,15 ml Mannitmonooleat; Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **Freund'sches Adjuvans, inkomplett**

(Sigma-Aldrich, Steinheim)

1 ml enthält 0,85 ml Paraffinöl und 0,15 ml Mannitmonooleat; Lagerung bei +2 bis +8 °C.

3.1.10 Lösungen und Reagenzien für die DNA-Präparation

- **Chloroform**

Chloroform 99,8% (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **Phenol**

Roti®-Phenol (Roth, Karlsruhe)

redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol

Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **Phenol/Chloroform**

Roti®-Phenol/Chloroform (Roth, Karlsruhe)

Enthält redestilliertes Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, gesättigt mit TE-Puffer

Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **Chloroform/Isoamylalkohol**

Enthält Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1

(VWR International, Darmstadt)

Lagerung bei +2 bis +8 °C.

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 7,4)	(VWR International, Darmstadt)	0,97 g
EDTA-Na ₂	(Serva, Heidelberg)	0,37 g
Aqua bidest. ad		1000,00 ml

Lagerung bei +2 bis +8 °C.

• Natriumzitat-Lösung

Natriumzitat-2-hydrat	(VWR International, Darmstadt)	3,8 g
Aqua bidest. ad		100,0 ml

- Verbesserung der Löslichkeit durch leichte Erwärmung, danach Autoklavierung und Lagerung bei +2 bis +8 °C.

• Sarkosyl-Puffer

Tris-HCl, pH 8,0		7,24 g
EDTA-Na ₂		9,31 g
Sarkosyl-N-Laurylsarkosinat		30,00 g
(Sigma-Aldrich, Steinheim)		
Aqua bidest. ad		1000,00 ml

Nach Lösung Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C.

• Natriumacetat-Lösung

Natriumacetat-Trihydrat	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	417,24 g
Aqua bidest. ad		1000,00 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf 5,2; danach Autoklavierung und Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C.

• Ethanol

Ethanol, 99%

(VWR International, Darmstadt)

Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C.

- **RNase-Lösung**

RNase A (Serva, Heidelberg)	0,5 g
TE-Puffer ad	100,0 ml

Aliquotierung in geeignete Volumina, dann Lagerung bei 20 ± 2 °C

- **Pronase-Lösung**

Pronase E	500,0 mg
(nukleasefreie Protease Typ XXV, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	
5x Pronasepuffer	100,0 ml
(20-fach Pronasepuffer: 11,69 g/100ml NaCl, 31,52 g/100ml Tris-HCl; pH 7,2)	

Nach dem Lösen 1-stündige Inkubation bei 37 °C, Aliquotierung in geeignete Volumina, dann Lagerung bei 20 ± 2 °C.

- **Sucrose-Lösung, 30%**

Saccharose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	300 g
TE-Puffer ad	1000 ml

Autoklavierung nach vollständiger Lösung, danach bei +2 bis +8 °C bis zu 12 Wochen haltbar.

- **QIAmp[®] DNA Mini Kit**

gebrauchsfertiges Reagenziensystem zur DNA-Präparation auf silikagelbasierender Spinsäulenttechnologie der Firma Qiagen, Hilden (vgl. Punkt 3.2.3.2); Die präparierte virale DNA dient als Template in der PCR.

3.1.11 Restriktionsenzymanalyse und PCR

- **Restriktionsendonukleasen**

(New England Biolabs, Frankfurt a. M.); alle verwendeten Enzyme erreichen ihr Aktivitätsoptimum bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C im jeweils zugehörigen Reaktionspuffer. Lagerung bei $\square 20$ °C.

- **DyNAzyme™ II DNA-Polymerase-Kit**

(Firma Finnzymes, Espoo, Finland)

Im Kit enthalten sind:

1. DyNAzyme™ II DNA-Polymerase
2. dTP Mix, enthält jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP gelöst in H₂O, pH 7,0
3. DyNAzyme™-Puffer, magnesiumfrei, 1-fach:

Tris-HCl, pH 8,8 bei 25°C)	10 mM
KCl	50 mM
Triton X-100	0,1%
4. 50 mM MgCl₂-Lösung
5. Control template (λ - DNA 0,5 ng/ μ l in TE-Puffer)
6. Control primer 1 und 2 (23-mers, Konz.: 25 μ M in Aqua bidest.)
7. Fertiger DNA-Größenstandard (Konz. 50 ng/ μ l in 8 mM Tris-HCl, pH 8,0; die Lösung enthält Glycerol und Bromphenolblau)

Lagerung bei $\square 20$ °C.

- **DEPC-H₂O**

1000 ml Aqua bidest. werden mit 1 ml Diethylpyrocarbonat versetzt und autoklaviert.

Aufbewahrung bei ± 2 bis ± 8 °C.

- **Mineralöl**

DNase-, RNase- und proteasefrei (ABGene, Hamburg)

Lagerung bei Raumtemperatur.

3.1.12 Elektrophorese

3.1.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

- **30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung**

ReadyMix IEF (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden).

Fertige Pulvermischung zur Herstellung einer 30%igen Stammlösung durch Zugabe von 100 ml Aqua bidest.

Lichtgeschützte Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **4% Acrylamidlösung**

0,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 6,8	112,5 ml
10% SDS	4,5 ml
Aqua bidest.	274,5ml
30% Acrylamidlösung	60,0 ml
(Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)	

Alle Reagenzien gut mischen, danach Filtration durch 0,45 µm Filtereinheit. Lagerung lichtgeschützt bei +2 bis +8 °C.

- **1,875 M Tris pH 8,8**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	113,4 g
Aqua bidest. ad	400,0 ml

Zur Herstellung einer Lösung ist längeres Rühren, evtl. auch unter leichter Erwärmung, erforderlich. Einstellung des pH-Wertes auf 8,8 mit konzentrierter HCl, danach Auffüllung mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 500 ml. Bei 2 bis 8 °C bis zu 6 Monate haltbar.

- **0,5 M Tris pH 6,8**

Tris	30,3 g
Aqua bidest.	400,0 ml

Nach dem Lösen Einstellung des pH-Wertes auf 6,8 mit 5 N HCl, danach Auffüllung mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 500ml. Bei 2 bis 8 °C bis zu 6 Monate haltbar.

- **Trenngel 12%**

30% Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden)	6,00 ml
1,875 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH 8,8)	3,75 ml
10% SDS	0,15 ml
Aqua dest.	5,00 ml
TEMED (Serva, Heidelberg)	10,00 µl
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Sigma-Aldrich, Steinheim) (0,1 g APS ad 1,0 ml Aqua dest.)	100,00 µl

Das Volumen des Ansatzes (15 ml) ist ausreichend für 2-3 Gele. Zur Vermeidung von Schaumbildung sollte das Mischen sanft erfolgen. TEMED und APS werden zuletzt hinzugefügt und nach kurzem Rühren wird das Gel zügig gegossen.

- **Sammelgel 4%**

4% Acrylamid	5 ml
TEMED	10 µl
10 % APS	30 µl

Das Volumen des Ansatzes (5 ml) ist ausreichend für 2-3 Gele. Zur Vermeidung von Schaumbildung sollte das Mischen sanft erfolgen.

TEMED und APS werden zuletzt hinzugefügt und nach kurzem Rühren wird das Gel zügig gegossen.

- **Elektrophoresepuffer (10x konzentriert)**

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (VWR International, Darmstadt)	30,3 g
Glycin (VWR International, Darmstadt)	144,2 g
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, Steinheim)	10,0 g
Aqua bidest. ad	800,0 ml

Lösung aller Reagenzien in 800 ml Aqua dest., dann Auffüllung auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml. Der pH-Wert sollte ohne Einstellung bei 8,3 liegen. Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

- **Auftragepuffer**

0,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH 6,8)	1,00 ml
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0,24 g
Bromphenolblau (VWR International, Darmstadt) (Stammlösung: 0,1% Bromphenolblau (w/v) in EtOH abs.: 100 mg/ml)	0,20 ml
Glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0,80 ml
Aqua bidest.	5,86 ml
2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0,16 ml

Alle Reagenzien kombinieren und für ca. 30 min. rühren. Aliquotierung in geeignete Volumina und Lagerung bei -20 °C.

- **Größenmarker**

(Bio Rad, München)

vorgefärbter SDS-PAGE-Broad-Range-Standard

Banden mit MW (kD) 204.000 (Myosin), 124.000 (β -Galaktosidase), 80.000 (BSA), 49.100 (Ovalbumin), 34.800 (Carbonic Anhydrase), 28.900 (soybean trypsin inhibitor), 20.600 (Lysozyme) und 7.100 (Aprotinin)

Bei -20 °C 1 Jahr haltbar. Vor dem Einsatz schnelles Auftauen bei 37 °C und anschließende 5-minütige Inkubation bei 37 °C zur Vermeidung von Agglutinationen.

3.1.12.2 Agarose-Gelelektrophorese

- **TAE-Puffer (20x konzentriert)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	96,0 g
Na-Acetat · 3 H ₂ O	54,0 g
EDTA-Na ₂	7,4 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Einstellung auf pH 7,2-7,4 mit konzentrierter HCl, Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **Agarose**

NEEO Ultra-Qualität (Roth, Karlsruhe)

Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Ethidiumbromid**

Stammlösung 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Blue Run (Farbmarker, 5x konzentriert)**

Glycerin (v/v) (Sigma-Aldrich, Steinheim)	30,0 %
Bromphenolblau (w/v) (VWR International, Darmstadt)	0,001%
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) (VWR International, Darmstadt)	50,0 mM
in Aqua bidest.	

Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Größenmarker**

- *1 Kb DNA Ladder (0,5-12,2 kb)*

(Gibco BRL, Eggenstein)

Banden bei 506, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198 und 12216 Basenpaaren (bp).



- *Ready-Load™ 1 Kb Plus DNA Ladder (01-12,0 kb; 0,1 µg/µl)*

(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Banden bei 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000 und 12000 Basenpaaren (bp).

Einsatz als Längenstandard bei der Restriktionsenzymanalyse, Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- *λ-DNA/Hind III und ϕ DNA/HAE III-Fragmente*

(Finnzymes, Espoo, Finnland)

Banden bei 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 und 23130 bp.

Einsatz als Längenstandard bei der Analyse der PCR-Produkte; Aufbewahrung bei -20 °C.

3.1.13 Lösungen und Reagenzien für die Präparation der viralen Proteine und die Western Blot-Analyse

- **1,0 M Tris pH 6,8**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 24,2 g

(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Aqua bidest. 170,0 ml

Zur Herstellung einer Lösung ist längeres Rühren, evtl. auch unter leichter Erwärmung, erforderlich. Einstellung des pH-Wertes auf 6,8 mit konzentrierter HCl, danach Auffüllung mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 200 ml. Bei +2 bis +8 °C bis zu 6 Monate haltbar.

- **0,2 M EDTA**

Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	7,44 g
Aqua bidest. (37°C) ad	100,00 ml

Zum Lösen des EDTA ist eine Aufwärmung auf 37 °C unter Rühren erforderlich. Nach Filtration (0,45 µm Membranfilter) bei +2 bis + 8 °C bis zu 8 Monate haltbar.

- **SDS-Lösung , 10%**

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	10 g
Aqua bidest. ad	100 ml

Lagerung bei Raumtemperatur.

- **SDS-Lösung, 20%**

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, Steinheim)	20 g
Aqua bidest. ad	100 ml

Lagerung bei Raumtemperatur.

Sucrose-Lösung, 30%

Saccharose (VWR International, Darmstadt)	30 g
Aqua bidest.	100 ml

Lagerung bei +2 bis +8°C.

- **Probenpuffer**

1,0 M Tris, pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	0,625 ml
Glycerol (VWR International, Darmstadt)	1,000 ml
0,2% Bomphenolblau (VWR International, Darmstadt)	0,200 ml
0,2 M EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim)	150,000 µl
2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0,400 ml
20% SDS (VWR International, Darmstadt)	1,000 ml
Aqua bidest.	10,000 ml

Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **Tris buffered Saline (TBS)**

NaCl (VWR International, Darmstadt)	8,09 g
KCl (VWR International, Darmstadt)	193,84 g
MgCl ₂ (VWR International, Darmstadt)	1,90 g
CaCl ₂ (VWR International, Darmstadt)	0,20 g
Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	0,97 g
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Einstellung auf pH 7,0 mit 5 N HCl und Autoklavierung; Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Semi-Dry-Blot-Puffer (5-fach)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	15,14 g
Glycin	72,07 g
EDTA	7,31 g
SDS	2,50 g
Methanol (VWR International, Darmstadt)	200,00 ml

Der resultierende pH-Wert der Lösung sollte 8,3 betragen. Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Semi-Dry-Blot-Puffer (1-fach)**

5-fach-Puffer	200 ml
Methanol (VWR International, Darmstadt)	160 ml
Aqua bidest.	640 ml

Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Coomassie Blue Stain**

Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, Steinheim)	1,25 g
Methanol	500,00 ml
Essigsäure (Eisessig) 100% (VWR International, Darmstadt)	100,00 ml
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Lösung des Coomassie in der angegebenen Menge Methanol. Während des Rührens Zugabe des Eisessigs und danach Verdünnung mit Aqua dest. auf das herzustellende Volumen. Filtration (0,45 μm Membranfilter) und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

- **10% Destain für Coomassiegele**

Methanol	100 ml
----------	--------

Essigsäure (Eisessig) 100%	100 ml
(VWR International, Darmstadt)	
Aqua dest.	800 ml

Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Magermilchpulver**
(Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Lagerung bei Raumtemperatur.

- **Tween20**
(VWR International, Darmstadt)

Lagerung bei Zimmertemperatur.

- **Chromogen Substrat**
(BioRad, München)

Aufbewahrung bei -20°C.

- **Methanol**
(Sigma-Aldrich, Steinheim)

Lagerung bei Zimmertemperatur.

- **Wasserstoffperoxid, 30%**
(VWR International, Darmstadt)

Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **Isopropanol**

(VWR International, Darmstadt)

Lagerung bei +2 bis +8 °C.

- **Goat-Anti-Rabbit Immunglobulin (IgG) Konjugat**

Meerrettich-Peroxidase markiert (Dianova, Hamburg).

Aliquotierung in geeignete Volumina, danach Aufbewahrung bei -20 °C.

3.2 Methoden

3.2.1 Primäre Hühnerembryofibroblasten-Kulturen (HEF)

3.2.1.1 Herstellung der HEF-Kulturen

Aus 9 bis 11 Tage bebrüteten SPF-Hühnereiern (siehe auch unter Punkt 3.1.2.1) werden die Embryonen steril herauspräpariert, Kopf, Beine und Flügel abgetrennt und die Eingeweide entfernt. Im Anschluß an eine grobe mechanische Zerkleinerung des Gewebes werden die Einzelzellen durch mehrfache Trypsinierung aus dem Gewebeverband des embryonalen Körpers herausgelöst und nach Zentrifugation in HEF-Zellkulturmedium mit Zusatz von 5% foetalem Kälberserum (FKS) resuspendiert. Nach Auszählung der in dieser Zellstammssuspension vorhandenen Zellen in einer Thoma-Kammer (Zellzahl pro ml Suspension ergibt sich aus dem Produkt der Zellzahl in 16 Kleinstquadraten, dem Kammerfaktor (5×10^4) und dem Verdünnungsfaktor) erfolgte eine Verdünnung auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml. Diese Konzentration wurde sowohl für die Anzüchtung als auch für die Vermehrung und Titration der PsHV-Isolate eingesetzt. Direkt im Anschluß an die Herstellung wurde die benötigte Menge an Zellsuspension zur Kultivierung in für den jeweiligen Verwendungszweck geeignete Zellkulturgefäße ausgesät. Alternativ dazu wurde die Zellstammssuspension in einem sterilen, geschlossenen Gefäß für 1-5 Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahrt und erst nach diesem Zeitraum zur Kultivierung in einen Monolayer ausgesät, wobei vorher mittels Trypanblaufärbung eines Aliquots eine erneute Zellzahlbestimmung und gleichzeitig eine Differenzierung zwischen vitalen, d.h. ungefärbten und abgestorbenen Fibroblasten vorgenommen wurde.

Eine genaue Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte bei der HEF-Herstellung findet sich in der Dissertationsschrift von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999).

3.2.1.2 Kultivierung und Subkultivierung

Die Kultivierung der HEFs erfolgte in MEM oder TCM-TAD mit Zusatz von 5% FKS (Anzuchtmedium) bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer Laminar Air-Flowbank des Typs Steril Card Hood der Firma The Baker Company (Sanford, Maine, USA) durchgeführt.

Nach Konfluenz des Zellrasens wurde das Anzuchtmedium durch MEM oder TCM-TAD mit Zusatz von 2% FKS (Erhaltungsmedium) ersetzt. Zur Subkultivierung wurde das Medium dekantiert, der Zellrasen einmal mit Trypsin-Versen-Lösung gewaschen und anschließend solange mit Trypsin-Versen-Puffer bei 37 °C inkubiert (ca 5-10 min), bis sich die Zellen ablösten. Nach Resuspendierung der Zellen in Anzuchtmedium erfolgte die Aussaat wiederum in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml.

3.2.1.3 Virusisolierung, -identifizierung und -vermehrung

3.2.1.3.1 Virusisolierung

Sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten Virusisolate wurden im Rahmen der virologischen Diagnostik in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen auf primären HEF-Kulturen isoliert.

Organproben von Herz, Leber, Niere, Milz, Darm und Gehirn aus Psittaziden mit Verdacht auf PPD (vgl. Punkt 3.1.1.1) wurden in einer Menge von ca. 10% in MEM mit 0,001% Enrofloxacinzusatz (Baytril[®], Bayer AG, Leverkusen) gesammelt und bis zur Verarbeitung bei 2 bis 8 °C aufbewahrt. Vor dem Beimpfen der Zellkultur wurden sie mittels Ultraschall homogenisiert (Branson sonifier, 3 Pulse bei 60%) und für 5 min. bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen zu mind. 70% geschlossenen Zellrasen verimpft, 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, 1 x mit MEM gespült und bei 37 °C für 7 Tage inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Monolayer täglich mikroskopisch

auf das Auftreten eines cpE kontrolliert, wobei im negativen Fall 3 Blindpassagen mit Zellkulturüberstand in HEF-Kulturen vorgenommen wurden.

3.2.1.3.2 Identifizierung der Virusisolate

Zur Identifizierung der neuen Virusisolate (vgl. Punkt 3.1.1.1) wurden die Art des verursachten cpE sowie die Empfindlichkeit gegenüber Chloroform und IUDR herangezogen. Zusätzlich wurde mit einem Zeiss Elektronenmikroskop 902 CEM (ZEISS, Oberkochen) im Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Langen, eine elektronenmikroskopische Visualisierung von Herpesvirionen sowohl im infektiösen Zellkulturüberstand nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat als auch in Ultradünnschnitten der infizierten, fixierten Zellkultur durchgeführt.

Detaillierte Versuchs- und Methodenprotokolle für die o.g. Untersuchungen sind in der Dissertationsschrift von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) niedergeschrieben.

3.2.1.3.3 Virusvermehrung

Die Virusisolate, größtenteils vorliegend als infektiöser Zellkulturüberstand der 3. bis 7. Passage, wurden in HEF-Kulturen einer Vermehrungspassage unterzogen. Hierzu wurden konfluente Monolayer mit einer Fläche von 25, 75 oder 225 cm² zweimal mit PBS gewaschen und mit jeweils 1,5 oder 5 ml der Virussuspension beimpft. Nach einer 1-stündigen Adsorptionsphase bei 37 °C wurde der Überstand abgesaugt und der Zellrasen vor Zugabe des Erhaltungsmediums 3 mal mit PBS gewaschen. Die Flaschen wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und täglich mikroskopisch kontrolliert. Nach Auftreten eines deutlichen cpE (80-90% der Zellen des Zellrasens betroffen) erfolgte die Ernte, wobei die Viruszüchtungen einem einmaligen Gefriertau unterzogen und anschließend niedertourig für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert wurde. Der von Zelltrümmern gereinigte virushaltige Überstand stand nunmehr für nachfolgende Anwendungen zur Verfügung.

3.2.1.4 Virustitrationen

Zur quantitativen Bestimmung des Virusgehaltes werden Virustitrationen auf der Basis der Endverdünnungsmethode durchgeführt. Hierbei werden gleichmäßig abgestufte Virusverdünnungen der Konzentrationen 10^{-1} bis 10^{-8} in MEM mit Zusatz von 5% FKS hergestellt. Innerhalb dieses Messbereiches verursachen in der niedrigsten Verdünnungsstufe 100% und in der höchsten Verdünnungsstufe 0% der Inokula einen cpE. Von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 100 μ l in mind. 6 Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Als Negativkontrolle zur Beurteilung der uninfizierten Zellkultur wurden 12 Kavitäten mit 100 μ l MEM+5% FKS befüllt. Im Anschluß daran erfolgte die Aussaat von 100 μ l Zellsuspension (Zellzahl: 5×10^5) in jede Kavität der Mikrotiterplatte.

Die Titterschätzung wurde durch Probit-Analyse mit dem Statistik-Computerprogramm CombiStats (EDQM, London) durchgeführt. Falls mittels Probit-Analyse kein Ergebnis ermittelt werden konnte, wurde die Berechnungsformel nach SPEARMAN und K RBER (modifiziert nach MAYR et al., 1974) zur Titterschätzung herangezogen. Der Titer berechnete sich demnach, vereinfacht dargestellt, über die Verdünnungsstufe, bei der 50% der Mikroulturen einen cpE aufwiesen.

3.2.1.5 Neutralisationstests

Eine 2er-Verdünnungsreihe der Kaninchen-Hyperimmunseren (vorher 30 min. bei 56 °C inaktiviert) in Zellkulturmedium wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte bis zu einer Verdünnung von 1:4096 vorbereitet. Hierzu wurden in jedes Loch der Mikrotiterplatte 25 μ l MEM + 5% FKS vorgelegt. In die ersten Kavitäten (Verdünnungsstufe 2^{-1}) wurden 25 μ l der jeweiligen Seren zugegeben und durch Mischen und anschließendes Übersetzen von 25 μ l in die jeweils darunterliegende Kavität bis zur Verdünnungsstufe 1:4096 verdünnt. Je Versuchsansatz wurde als Negativkontrolle ein Kaninchen-Negativserum mitgeführt und in gleicher Weise verdünnt wie die Hyperimmunseren. Zu den Serumverdünnungen wurden 25 μ l einer

vorher titrierten Virussuspension mit einem konstanten Virusgehalt von 100 ZKID₅₀ pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 50 μ l frisch hergestellte bzw. subkultivierte HEF in MEM + 5% FKS (Zellzahl: 5×10^6 Zellen/ml) in jede Kavität hinzugegeben. Auf jeder Platte dienten die Kavitäten der letzten Spalte (12 Löcher von 2^{-1} bis 2^{-12}) als unbeimpfte Zellkontrollen und wurden daher lediglich mit 25 μ l MEM+ 5% FKS sowie 50 μ l der o.a. Zellsuspension befüllt. Nach 5-tägiger Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Testplatten lichtmikroskopisch abgelesen und beurteilt, wobei die Spezifitätsgrenze für eine positive Reaktion bei einem Titer von 1:4 definiert wurde.

3.2.1.6 Berechnung des PK-Wertes

Die Verwandtschaftsverhältnisse der Virusisolate wurden in Anlehnung an die Vorgehensweise von HERBST (1983) mittels der prozentualen Neutralisationskapazität (PK-Wert) ermittelt.

Die PK-Werte wurden wie folgt berechnet:

$$PK = 100 \times \frac{\log \text{Titer heterologes Serum}}{\log \text{Titer homologes Serum}}$$

Die hierbei zu erwartenden Werte liegen zwischen 0 und 100.

Die Beurteilung der serologischen Verwandtschaftsgrade folgt der Einteilung von GIAMBRONE und SOLANO (1988):

0-30: nicht verwandt; 31-70: verwandt; 70: identisch

3.2.2 Herstellung von Hyperimmunsereen in Kaninchen

3.2.2.1 Virusreinigung mit gleichzeitiger Antigenanreicherung

Die Virusreinigung und -anreicherung erfolgte in Anlehnung an ein von LANCZ (1973) beschriebenes Verfahren. Durch Präzipitation mit Polyethylenglycol (MW: 6000) und anschließende 3-malige Elution lassen sich 80-90% an Begleitproteinen nichtviralen Ursprungs aus Virussuspensionen entfernen, wobei sich gleichzeitig eine etwa 60-fache maximale Antigenkonzentrierung erreichen läßt. Die aus der zweiten und dritten Elution gewonnenen Überstände wurden gepoolt und der nach erneuter Zentrifugation daraus gewonnene Überstand mit Adjuvans versetzt und zur Immunisierung der Kaninchen verwendet.

Die genaue Vorgehensweise bei der Virusreinigung und -anreicherung ist in der Dissertation von GRAVENDYCK (1996) beschrieben.

3.2.2.2 Immunisierung der Kaninchen

Wie bereits unter Punkt 3.2.2.1 erwähnt, wurden von den fünf Referenzstämmen sowie von einer nicht infizierten HEF-Kultur die gepoolten Überstände aus der zweiten und dritten Elution nach Präzipitation mit PEG 6000 zur Immunisierung der Kaninchen eingesetzt. Zur Erstimpfung am Tag 0 wurde komplettes Freund'sches Adjuvans im Verhältnis 1:2 zum Immunogen zugefügt (0,9 ml Immunogen + 0,9 ml komplettes Freund'sches Adjuvans) und mittels Ultraschallbehandlung emulgiert, um eine stabile Wasser-in-Öl-Emulsion herzustellen. Dies erhöht die Immunogenität der Antigensuspension bzw. erzeugt eine schnellere Immunantwort und höhere Antikörpertiter im Serum des Kaninchens. Es erfolgten zwei Boosterimpfungen im Abstand von 4 Wochen (Tag 30 und 60), wobei anstelle des kompletten Freund'schen Adjuvans das inkomplette verwendet wurde.

Der Impfstoff wurde intradermal an zahlreichen verschiedenen Stellen in die Haut von Nacken und Rücken injiziert. Hierbei wurden möglichst kleine Depots von weniger als 0,1 ml je Lokalisation appliziert.

3.2.2.3 Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurden die Kaninchen nacheinander auf einem Tisch von einer Hilfsperson so fixiert, dass sie sich möglichst nicht bewegen konnten. Nach Rasur der Außenfläche des Ohres wurde die Haut mit einem Alkoholtupfer desinfiziert und anschließend die in der Ohrmitte vom Ansatz bis zur Spitze verlaufende Arterie durch wiederholtes Reiben und Klopfen so lange stimuliert, bis sie dick angeschwollen war. Mit einer Kanüle wurde das Gefäß punktiert, wobei es sich dabei als zweckmäßig erwies, vorher den Kunststoffaufsatz (luer lock) zu entfernen, um eine Gerinnung des Blutes in der Kanüle und somit ein Sistieren des Blutflusses zu verhindern. Auf diese Art läßt sich bei einem 3 bis 5 kg schweren Tier bis zu maximal 50 ml Blut entnehmen. Anschließend wurde die Kanüle entfernt, die Injektionsstelle abgeklemmt und der Einstich nochmals mit Ethanol desinfiziert, um ein schnelleres Zusammenziehen des Gefäßes zu bewirken.

Jedem Kaninchen wurde am Tag 0 unmittelbar vor der ersten Immunisierung eine Menge von ca. 20 ml Blut zur Gewinnung von Negativserum entnommen. Es erfolgten drei weitere Blutentnahmen zwei Wochen nach der zweiten (Tag 45) sowie zwei bzw. vier Wochen (Tag 75 bzw. Tag 90) nach der dritten Impfung, wobei jeweils ca. 40 ml Blut entnommen wurden.

3.2.2.4 Serumgewinnung

Nach der Abnahme wurde das Blut für 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit setzte sich der Blutkuchen mit allen zellulären Bestandteilen ab. Zur Erhöhung der Serumausbeute erfolgte danach eine Lagerung über Nacht im

Kühlschrank bei 2 bis 8 °C. Am nächsten Tag wurde das Serum im Überstand vorsichtig dekantiert und durch Zentrifugation bei 5000 bis 10.000 rpm von noch vorhandenen festen Bestandteilen getrennt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 56 °C zur Inaktivierung hitzelabiler unspezifischer Inhibitoren wurden die Seren aliquotiert und entweder für den weiteren Gebrauch direkt eingesetzt oder für spätere Anwendungen bei -20 °C eingefroren.

3.2.3 Restriktionsenzymanalyse

3.2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion viraler DNA

Eine Phenol-Chloroform-Extraktion dient zur weitgehenden Entfernung von kontaminierenden Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Proteine reichern sich hierbei in der Interphase an und können entfernt werden.

Eine DNA-Extraktion wurde bei den unter Punkt 3.1.1.1 aufgelisteten neuen PsHV-Isolaten sowie bei den unter 3.1.1.3 genannten Referenzstämmen jeweils in mindestens drei getrennten Wiederholansätzen durchgeführt. Dabei wurde in Vorversuchen die DNA sowohl wie hier beschrieben aus dem Zellkulturüberstand als auch nach der in der Dissertationsschrift von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) beschriebenen Methode aus dem Zellkultursediment extrahiert.

Viruszüchtungen auf HEF-Kulturen in einer Menge von ca. 250 ml je Virusisolat (siehe auch unter Punkt 3.2.1.3.3) dienten als Ausgangsmaterial für die Extraktion viraler DNA. Zellen und Überstand wurden mit einem Zellkulturschaber geerntet, dreimal hintereinander eingefroren und wieder aufgetaut und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 g von Zelltrümmern geklärt. Anschließend wurde das Virus durch erneute Zentrifugation für 4 Stunden bei 40.000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml TE-Puffer resuspendiert, auf ein 30%iges Sucrose-TE-Puffer-Kissen geschichtet und bei 40.000 g für 1 Stunde zentrifugiert. Das Viruspellet wurde 3 mal mit TE-Puffer gewaschen, in 2,5 ml TE-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 0,5% SDS und 0,4 ml Pronase-Lösung pro ml über Nacht bei 56 °C inkubiert.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) wurde im Volumenverhältnis von 1:1 zur Nukleinsäurelösung gegeben, gut gemischt und anschließend zur Verbesserung der Phasentrennung für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die Nukleinsäuren und wurde vorsichtig in ein zweites Zentrifugenröhrchen überführt. Um Spuren von Phenol zu entfernen, wurde die gleiche Menge an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugefügt, vollständig vermischt und erneut für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Die nun gebildete wässrige Phase wurde mit Ethanol/Na-Acetat präzipitiert (Ethanolpräzipitation 3.2.3.2).

3.2.3.2 Ethanolpräzipitation von DNA

Um die DNA auszufällen, wurden der nukleinsäurehaltigen Lösung 2,5 Volumen eiskaltes 100%iges Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetalösung, pH 5,2 zugesetzt (0,3 M Endkonzentration). Das Salz unterstützt die Zerstörung der Hydrathülle der Nukleinsäure und erleichtert die Fällung. Die Präzipitation erfolgte nun entweder über Nacht bei ≈ 20 °C oder für ca. zwei Stunden bei ≈ 70 °C. Das Präzipitat wurde dann durch Zentrifugation (Heraeus Kühlzentrifuge, 10.000 g, 20 min, 4 °C) pelletiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Nach Lufttrocknung wurde die DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

3.2.3.3 Quantifizierung von DNA-haltigen Lösungen

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte photometrisch (Bio-Photometer, Eppendorff, Hamburg) durch Messung der Absorption eines Aliquots in Quarzglasküvetten bei Wellenlängen von 260 und 320 nm. Hierzu wurde die DNA-Lösung zuvor 1:100 verdünnt. Als Blank- bzw. Referenzwert wurde die Absorption gegen TE-Puffer ermittelt. Die Konzentration (c) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = (E_{260} - E_{320}) \times 50 \times \text{Verdünnung}$$

3.2.3.4 Restriktionsspaltung von DNA

Die für die spezifische Spaltung von DNA-Molekülen eingesetzten Restriktionsendonukleasen der Klasse II dienen der bakteriellen Zelle in vivo zum Schutz vor Fremd-DNA, die z.B. durch Phagenbefall eingebracht werden kann. Diese unerwünschte Fremd-DNA wird fragmentiert; zelleigene DNA ist durch charakteristische DNA-Modifikationen (Methylierungen) geschützt. Die Endonukleasen bilden zusammen mit Methylasen sog. Restriktions-Modifikations-Systeme.

In dieser Arbeit wurden die Restriktionsverdau zwecks Analyse der viralen DNA mit den unter Punkt 3.1.1.1 genannten neuen PsHV-Isolaten durchgeführt. Die hierbei verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen im Hinblick auf Zusammensetzung des Puffers, Inkubationszeit und -temperatur richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers. Eine Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) für die Dauer von einer Stunde. Der Enzymanteil im Ansatz sollte 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die hohen Glycerolkonzentrationen in den Aufbewahrungspuffern der Enzyme die Reaktion negativ beeinflussen.

Anhand der photometrisch gemessenen Konzentration jeder DNA-Lösung wurde die für eine Spaltung von 10 μ l DNA benötigte Menge an Restriktionsenzym (1x) sowie Puffer ermittelt. Zur Bestimmung der Enzymkonzentration, bei der eine optimale Spaltung erfolgt, wurde in Vorversuchen (vgl. Punkt 4.3.1) jeweils die Zugabe einer 1-, 2-, 5-, 10- und 20-fachen Menge an Restriktionsenzym getestet.

3.2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Spaltfragmente und die Analyse der PCR-Produkte (Punkt 3.2.4) erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in 0,8% bzw. 2 %igen Agarosegelen mit einem Ethidiumbromidgehalt von 0,02 µl/ml Gel. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. 2 bzw. 5g Agarose wurden in 250 ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 50 bis 60 °C wurde das Gel mit Ethidiumbromid versetzt, gemischt und in den vorbereiteten Schlitten der Elektrophoresekammer (Super Sub, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) gegossen. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht.

Die Ansätze wurden vor dem Auftragen mit ca. 1/10 Volumen Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Dabei wurden die Proben in den in den Tabellen 3 bis 5 angegebenen Reihenfolgen aufgetragen. Als Längenstandard diente eine 1 kb-Leiter. Zur Auftrennung der Restriktionsfragmente wurde die Elektrophorese für 20 Stunden bei einer konstanten Spannung von 50 Volt durchgeführt. Die Elektrophorese für die Analyse der PCR-Produkte erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt über 2,5 Stunden bzw. bis die Bromphenolblau-Bande des Auftragspuffers □ des Gels durchlaufen hatte.

Nach dem Lauf wurden die DNA-Fragmente im Gel auf einem UV-Transilluminator (Mighty Bright, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) bei einer Wellenlänge von 302 nm analysiert und mit einer Sofortbildkamera (Polaroid DS-34, Polaroid GmbH, Offenbach, Orange-Rot-Filter) photographisch dokumentiert.

Die Polaroidfotos der Gele wurden eingescannt und die Restriktionsfragmente manuell markiert. Die entstandenen Skizzen wurde im Anschluß daran ohne die Fotos als schematische Darstellungen ausgedruckt.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.4.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur enzymatischen, selektiven Amplifikation von DNA, wobei selbst sehr geringe DNA-Mengen stark vervielfältigt werden können. Eine PCR ermöglicht die spezifische Amplifikation eines DNA-Fragments, das zwischen zwei bekannten Sequenzen liegt (SAIKI et al., 1985). Das Prinzip beruht auf der Bindung zweier Oligonukleotide, die zu bestimmten Sequenzabschnitten der DNA komplementär sind, so dass sie den zu amplifizierenden Bereich einrahmen. Das als Plusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid ist hierbei komplementär zum antiparallelen Strang der DNA, während das als Minusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden Strang ist. Nach Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen (Denaturierung) lagern sich die beiden massiv im Überschuß zugesetzten Oligonukleotidprimer bei Absenkung der Reaktionstemperatur an die einzelsträngige Template-DNA an (□Annealing□). Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der jeweils verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht (Elongation).

3.2.4.2 Anzüchtung der Virusisolate für die PCR

Alle in den Tabellen 3 bis 5 aufgelisteten PsHV-Isolate wurden mittels PCR untersucht.

Als Ausgangsmaterial für die Präparation der viralen DNA dienten Viruszüchtungen in HEF-Kulturen in einer Menge von ca. 5 ml je Virusstamm.

Nach dem Auftreten eines deutlichen cpE (70 bis 80% des Zellrasens betroffen) wurden Zellen und Überstand mit einem Zellkulturschaber geerntet und durch 5-minütige

Zentrifugation bei 3000 g in Sediment und Überstand getrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert.

3.2.4.3 Präparation der viralen DNA

Die Aufarbeitung der viralen DNA erfolgte mit einem Kit auf Basis von Anionenaustauschersäulen (QIAmp® DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden) unter Anwendung des im beiliegenden Handbuch empfohlenen Protokolls.

Nach Abbau der zellulären Proteine mittels Proteinase K wurde die DNA-Präparation durch Zugabe eines Puffers auf eine gewisse Salzkonzentration gebracht und dann auf die Anionenaustauschersäule gegeben. Die stark geladenen Nukleinsäuren binden an das Säulenmaterial, während die weit weniger stark negativ geladenen Proteine unter diesen Bedingungen durchlaufen. Mit einem Puffer höherer Ionenstärke wurde anschließend die RNA von der Säule gewaschen und schließlich die DNA mit einem Puffer von noch höherer Ionenstärke bzw. niedrigerem pH eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.2.4.4 Vorbereitung der Oligonukleotidprimer

Die Primer-Lyophilisate wurden je nach der vom Hersteller angegebenen Konzentration durch Zugabe von DEPC-H₂O auf eine Konzentration von 25 pmol/µl eingestellt.

3.2.4.5 Reaktionsansätze der PCR

Ein PCR-Standardansatz (□Master Mix□) von 25 µl wies folgende Zusammensetzung auf:

- 2,5 µl DNA (100 ng)
- 1,0 µl Primer 1 (25 pmol)
- 1,0 µl Primer 2 (25 pmol)
- 2,50 µl 10x Reaktionspuffer (1x)
- 1,25 µl MgCl₂ (2,5 mM)
- 0,25 µl dNTP-Mix (0,1 M)
- 0,375 µl Polymerase (0,75 U)
- 16,125 µl DEPC-H₂O

Um der Bildung von unspezifischen Produkten vorzubeugen, wurde der Master Mix auf Eis angesetzt. Ebenfalls auf Eis wurden 2,5 µl der zu amplifizierenden Template-DNA-Lösungen (100 ng), 2,5 µl der aus der uninfizierten HEF-Kultur präparierten DNA sowie zuletzt eine entsprechende Menge an DEPC-H₂O als testinterne Negativkontrolle jeweils in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Jeder Probe wurden 22,5 µl des Master Mixes zugefügt. Nach gründlicher Mischung, kurzer Zentrifugation und anschließender Überschichtung mit 15 µl Mineralöl wurden die Ansätze schließlich in den vorprogrammierten Thermocycler (Trio Thermo Block, Biometra, Göttingen) verbracht.

Alle Arbeiten wurden unter ausschließlich für PCR-Zwecke genutzten Laminar Flow-Arbeitsbänken durchgeführt. Die Präparation der DNA, die Herstellung des Master Mixes sowie das Ansetzen der PCR-Reaktion erfolgten an räumlich getrennten Arbeitsplätzen. Ferner wurden sowohl zwischen als auch innerhalb der einzelnen Arbeitsschritte mehrmals die Handschuhe gewechselt.

3.2.4.6 Zyklusbedingungen der PCR

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

Tabelle 10: Zyklusbedingungen der PsHV-PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2001)

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1x	5 min	94 °C
Denaturierung	40x	30 s	94 °C
□Annealing□		45 s	60 °C
Extension		90 s	72 °C
Verlängerte Extension	1x	5 min	72 °C

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Ansätze im Thermocycler auf 4 °C gekühlt. Falls im Anschluß eine direkte Analyse nicht möglich war, wurde das Amplifikat unter dem Mineralöl herauspipettiert und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

Zur Analyse wurden 13 µl der PCR-Produkte mit jeweils 2 µl Auftragspuffer versetzt und in einem 2%igen Agarosegel unter den in Punkt 3.2.3.5 genannten Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker dienten ein bereits mit Auftragspuffer gemischter Ready-to-Use-Längenstandard (Mix aus λ -DNA/*Hind* III bzw. ϕ -DNA/*Hae* III-Spaltfragmenten, siehe auch unter Punkt 3.1.12.2), von dem 4,5 µl in die erste Tasche jedes Gels eingefüllt wurden.

3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse

3.2.5.1 Extraktion viraler Proteine aus infizierten Zellkulturen

Der Western Blot wurde mit den in Tabelle 5 genannten Referenzstämmen durchgeführt.

Dabei dienten Viruszüchtungen auf HEF-Kulturen in einer Menge von 5 Zellkulturflaschen a 75 cm² je Virusisolat als Ausgangsmaterial für die Präparation der viralen Proteine. Die gleiche Anzahl von Zellkulturflaschen wurde mit Zellkulturmedium statt mit Virus beimpft und diente als Negativkontrolle (vgl. Punkt 3.1.1.4). Nach Ausbildung eines deutlichen cpE (70 bis 80% des Zellrasens verändert) wurden die Überstände aller 5 Zellkulturflaschen eines Virusisolates gepoolt und bis zur Zentrifugation in Röhrchen auf Eis gelagert (Überstand). Der Zellrasen wurde nach Zugabe von 2 bis 3 ml Hank's-Lösung vorsichtig mit Hilfe von Zellkulturschabern vom Boden jedes Gefäßes gelöst, für jeden Virusstamm ebenfalls gepoolt und in Zentrifugenröhrchen auf Eis gelagert (Zellfraktion). Die Überstände wurden für 15 min bei 600 g und 2-8 °C zur Pelletierung von Zellen und Zelltrümmern zentrifugiert, vorsichtig abpipettiert und auf Eis gelagert. Die Pellets aus dieser Zentrifugation wurden den Röhrchen mit der jeweiligen Zellfraktion hinzugefügt und diese wurden zur Pellettierung der Zellen gleichsam einer niedertourigen Zentrifugation (600 g, 15 min, 2-8 °C) unterworfen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Probenpuffer resuspendiert. Nach 5-minütigem Aufkochen in einem kochenden Wasserbad wurden die Proben zum Aufbrechen evtl. vorhandener DNA-Doppelstränge zur Vermeidung einer Schmierbildung bei der späteren elektrophoretischen Auftrennung gründlich gerüttelt, etikettiert und bei -70 °C eingefroren. Der Überstand wird in Ultrazentrifugengläsern auf ein 30%iges Sucrosekissen geschichtet und bei 100.000 g für 60 min bei 2 bis 8 °C zur Pelletierung der Viruspartikel zentrifugiert (Centrikon T 2070, Kontron Instruments, Zürich). Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abpipettiert, das Viruspellet in 1 ml Probenpuffer resuspendiert und nach 5-minütigem Aufkochen bei -70 °C eingefroren.

3.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Prinzip der SDS-PAGE beruht auf der Trennung eines Antigengemisches in einem Polyacrylamid-Gel in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (=Sodiumdodecylsulfat = SDS) mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Durch Anlagerung von SDS-Molekülen wird bei dieser Methode eine einheitliche Negativladung aller Proteine erreicht, so dass nur die Größe der Partikel die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflusst. Durch Quervernetzung eines Acrylamidpolymers mit einer geringen Menge von Bisacrylamid entsteht eine charakteristische Porengröße. Der Grad der Vernetzung lässt sich durch die Variation der Verhältnisse der Einzelkomponenten verändern. Aufgrund der negativen Ladung wandern die Proteine im Spannungsfeld zum positiven Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Zur Herstellung der Gele wurden die aus je zwei Glasplatten vorgefertigten Gelkammern zu zwei Dritteln mit dem flüssigen Trenngelgemisch gefüllt. Die Mischung wurde mit Aqua bidest. überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten und zu Auspolymerisation für 20 min stehen gelassen. Danach wurde das Aqua bidest. abgegossen, das Sammelgel auf das Trenngel gegeben, ein Kamm eingesetzt, wiederum mit Aqua bidest. überschichtet, und zur Auspolymerisation für 60 min stehen gelassen. Anschließend wurde das Aqua bidest. abgegossen, das Sammelgel auf das Trenngel gegeben, ein Kamm eingesetzt und wiederum mit Aqua bidest. überschichtet. Die Gelkonstruktion wurde in die mit 1-fach Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer (Mighty Small II, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA), verbracht. Mittels einer Spritze werden im am unteren Rand des Gels gefangene Luftblasen entfernt und die Taschen des Gels gewaschen. Die im Sample-Buffer gelösten Proben werden für 3 min im kochenden Wasserbad aufgekocht, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 50 mA so lange aufgetrennt, bis die Farbfront des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hat.

3.2.5.3 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper (BURNETTE et al., 1981). Um die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, müssen sie zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden. Als Träger eignen sich hierbei vor allem Nylon- oder Nitrozellulosemembranen.

Der Transfer erfolgt auf elektrophoretischem Weg in die proteinbindende Membran. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprüngliche Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran laufen und dort gebunden werden. Beim Semi-Dry Blot werden Gel und Membran, sandwichartig eingerahmt von Filterpapieren, welche bei der Elektrophorese als Ionenreservoir fungieren, zwischen die Elektroden gelegt. Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Acrylamidgel für 5 min in Transferpuffer equilibriert. Eine Nitrozellulosemembran (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und zusammen mit insgesamt 6 Lagen Filterpapier (Sigma-Aldrich, Steinheim) ebenfalls kurz in Transferpuffer getränkt. 3 Lagen Filterpapier wurden auf den positiven Pol der Semi-Dry-Blotkammer gelegt und die Nitrozellulosemembran sowie im Anschluß daran das Acrylamidgel luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Bevor die Transferkammer geschlossen wurde, wurden nochmals 3 getränkte Filterpapiere auf dem Gel platziert. Der Transfer erfolgte bei 150mA pro Gel über 45 min.

3.2.5.4 Immunoblotting

Im Anschluß an den Transfer wurde die Membran für mind. 1 Stunde , ggf. auch über Nacht, bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit TBS+5% Magermilchpulver abgesättigt. Nach der Absättigung wurde die Nitrozellulosemembran für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4 °C mit dem 1:100 in TBS verdünnten Erstantikörper (polyklonales Kaninchen-Hyperimmunserum gegen PsHV, vgl. Punkt 3.1.4.1) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS + 0,05% Tween 20 gewaschen und mit einem Peroxidase-markierten Anti-Spezies Antikörper (1:1000 in TBS verdünnt) für 1 Stunde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem gründlichen Waschen (1x 10 min in TBS, 2x 10 min in TBS+0,1%Tween20; 2x 5 min in TBS) wurde die Membran schließlich in eine mit frisch angesetzter Entwicklungslösung (50 ml TBS+30% Wasserstoffperoxid, 30% wird zusammengesüttet mit einer getrennt angesetzten Lösung aus 10 ml eiskaltem Methanol + 30 mg Chromogen Substrat) gefülltes Behältnis gelegt und solange geschwenkt, bis eine Farbreaktion erkennbar ist. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Aqua dest. wird die Membran mehrmals abgespült und photographisch dokumentiert bzw. getrocknet und zur Aufbewahrung in Folie eingeschweißt.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung der Virusisolate

Die nachfolgenden Untersuchungen zur Identifizierung der Herpesvirusätiologie wurden nur bei den unter Punkt 3.1.1.1 in der Tabelle 2 aufgelisteten 14 neuen Virusisolaten durchgeführt. Die in Tabelle 3 (vgl. Punkt 3.1.1.2) genannten sonstigen PsHV-Isolate wurden im Zeitraum von 1987 bis 1996 im Rahmen der virologischen Diagnostik im Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen auf HEF-Kulturen isoliert und wie unter Punkt 3.2.2.3 beschrieben als Herpesviren identifiziert.

4.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Sowohl im infektiösen Zellkulturüberstand nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat (Abbildung 5) als auch in Ultradünnschnitten aus der fixierten, infizierten Zellkultur nach Einbettung in Epon-Kunstharz (Abbildung 4) aller in der Tabelle 2 genannten neuen PsHV-Isolate wurden im Paul-Ehrlich-Institut in Langen Partikel gefunden, die aus einem ikosaedrischen Kapsid von etwa 100 nm Durchmesser bestanden. Dieses war in den meisten Fällen vollständig umhüllt, teilweise waren jedoch auch nur Hüllfragmente erkennbar. Relativ häufig waren Partikel zu sehen, bei denen zwei Kapside von einer gemeinsamen Hülle umgeben waren (siehe Abbildung 4 linkes Bild sowie Abbildung 5 rechtes Bild). Größe und Aussehen der dargestellten Virionen konnten von anderen bekannten Herpesviren nicht unterschieden werden. Sonstige virusähnliche Partikel wurden nicht gefunden.

Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Darstellung von Psittaziden-Herpesvirionen (hier: PsHV-Isolat 661/01) im Ultradünnschnitt der infizierten, fixierten Zellkultur (Einbettung in Epon-Kunstharz); Balken entsprechen jeweils 100 nm

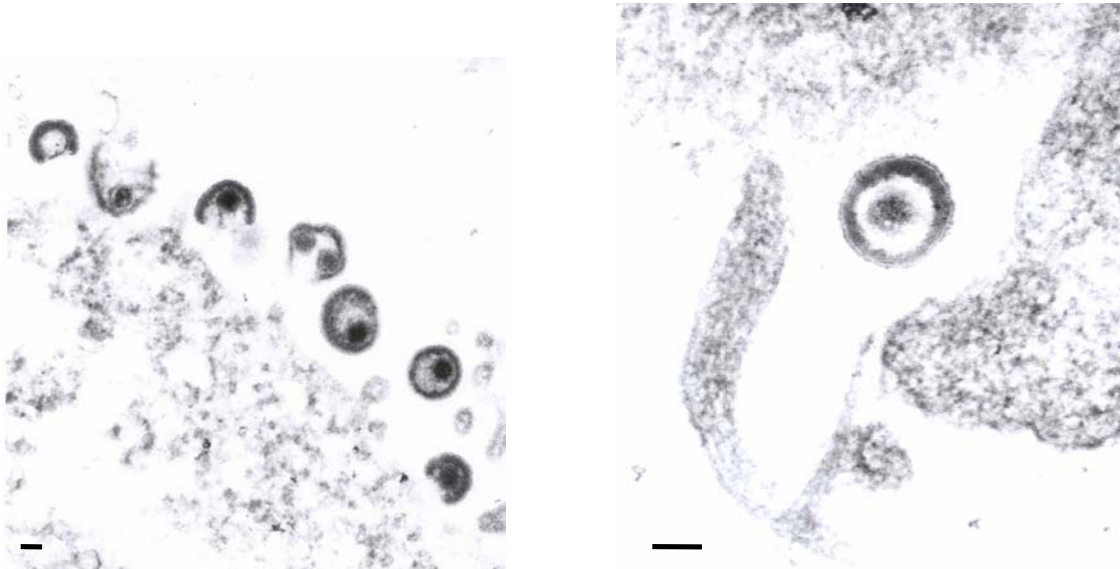
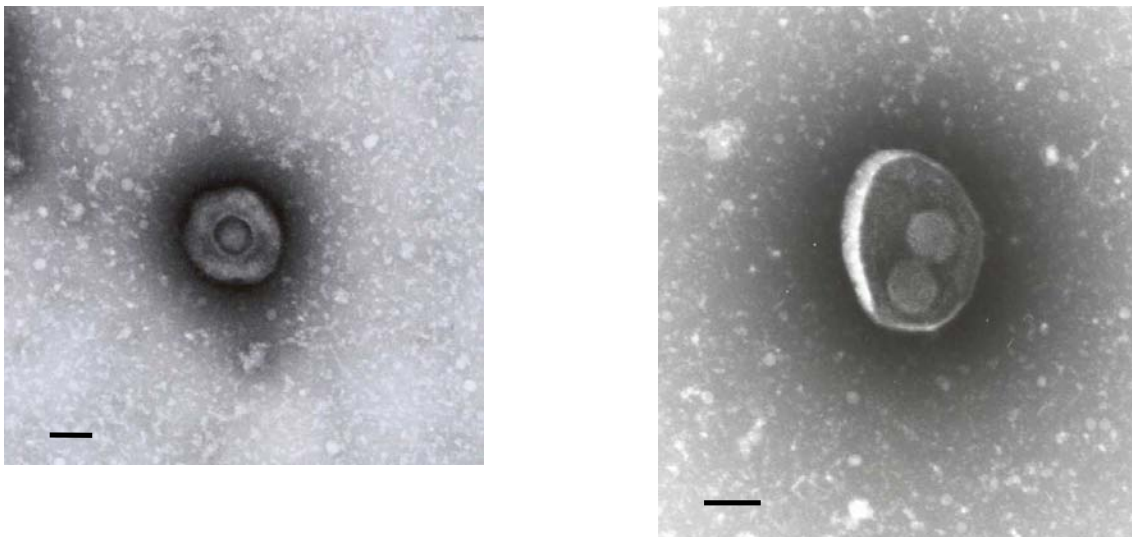


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Darstellung von Psittaziden-Herpesvirionen (hier: PsHV-Isolat 670/01) im Zellkulturüberstand nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat; Balken entsprechen jeweils 100 nm



4.1.2 Chloroformresistenztest

Das Versetzen von virushaltigem Zellkulturmaterial mit 10%igem Chloroform führt bei allen 14 untersuchten Isolaten zu einer vollständigen Zerstörung der Infektiosität. Im Vergleich dazu kommt es bei den jeweils identisch mitgeführten, unbehandelten Kontrollproben nicht zu einem Titerabfall (vgl. Tab. 11).

4.1.3 Kultivierung mit IUDR

Im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kontrollproben führt die Kultivierung in Gegenwart von 50µg/ml IUDR im Erhaltungsmedium bei allen unter Punkt 3.1.1 genannten Isolaten zu einer Hemmung der Virusvermehrung (vgl. Tab.11) um einen Faktor von 10^1 bis 10^2 .

Tabelle 11: Virustiter der 14 neuen Isolate in log GKID₅₀/ml nach Behandlung mit Chloroform (CB) bzw. bei Kultivierung in Gegenwart von IUDR verglichen mit einer unbehandelten Kontrollprobe

Isolat Nr.	Unbehandelte Kontrollprobe (log GKID₅₀/ml)	IUDR¹ (log GKID₅₀/ml)	Differenz	CB² (log GKID₅₀/ml)
3112/97	7,5	6,1	1,4	<1,0
2753/98	5,0	3,1	1,9	<1,0
862/98	7,4	6,8	0,6	<1,0
564/99	6,8	5,1	1,7	<1,0
2009/99	7,8	5,8	2,0	<1,0
2490/00	6,7	4,8	1,9	<1,0
279/00	4,9	3,7	1,2	<1,0
180/01	6,0	4,1	1,9	<1,0
181/01	5,3	3,5	1,8	<1,0
661/01	7,9	6,2	1,7	<1,0
663/01	7,2	5,4	1,8	<1,0
670/01	7,6	5,7	1,9	<1,0
54/01	7,1	5,3	1,8	<1,0
131/01	6,4	4,6	1,8	<1,0

Legende zur Tabelle 11:

¹ IUDR: Zusatz von 5-Iodo-2-Desoxyuridin (50µg/ml) ins Zellkulturmedium

² CB: Behandlung des Zellkulturüberstandes mit 10% Chloroform

4.1.4 Beobachtete zytopathische Veränderungen in HEF-Kulturen

4.1.4.1 Virusisolierung aus Organmaterial

Homogenisate aus den unter Punkt 3.1.1.1 sowie in der Tabelle 12 genannten Organen wurden jeweils auf primäre HEF-Kulturen verimpft und für einen Zeitraum von 7 Tagen täglich auf das Auftreten eines CPE kontrolliert. Im negativen Fall wurden bis zu 3 Blindpassagen mittels Subkultivierung vorgenommen. Zytopathische Veränderungen fanden sich besonders häufig bei den mit Herz- oder Lungenhomogenisaten inokulierten Zellkulturen. Dagegen waren die Isolationsraten aus Leber und Milz geringer. Die Anzüchtung aus Nieren- und Darmgewebe (hier: Darmgewebe aus dem Bereich des Ileums) war deutlich weniger erfolgreich und bei den untersuchten Gehirnproben (hier Entnahme aus dem Bereich des Stammhirns) gelang sie nur relativ selten. Im Falle des Isolates 279/00 gelang die Virusisolierung aus homogenisiertem Gewebematerial eines chirurgisch entfernten „Papilloms“ aus der Kloake.

Tabelle 12: Ergebnisse der Virusisolierungen aus Homogenisaten unterschiedlicher Organe

Isolat Nr.	Herz	Leber	Milz	Darm ²	Niere	Ge- hirn ³	Lunge	Sonsti- ge
3112/97	+	+	+	+	+	+	n.u.	n.u.
2753/98	+	+	-	-	-	-	n.u.	n.u.
862/98	+	+	+	-	-	-	n.u.	n.u.
564/99	+	-	+	+	-	-	+	n.u.
2009/99	+	+	+	+	+	+	+	n.u.
2490/00	+	+	+	+	+	+	n.u.	n.u.
279/00	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+ ¹
180/01	+	+	-	-	+	-	+	n.u.
181/01	+	-	-	+	-	-	+	n.u.
661/01	+	+	+	+	+	+	+	n.u.
663/01	+	+	+	+	+	+	+	n.u.
670/01	+	+	+	+	+	+	+	n.u.
54/01	+	-	+	-	+	-	n.u.	n.u.
131/01	-	+	+	-	+	-	n.u.	n.u.
positiv (n)	12	10	10	8	9	6	7	1
negativ (n)	1	3	3	5	4	7	0	0
positiv (%)	92,3	76,9	76,9	61,5	69,2	46,2	100	100,0

Legende zur Tabelle 12:

+: es wurde Herpesvirus isoliert

-: es wurde kein Herpesvirus isoliert

n.u.: nicht untersucht

¹: Sonstige Organe-Kloakenpapillom

²: Darm- es wurde Ileum für die Virusisolierung eingesetzt

³: Gehirn: es wurde Stammhirn eingesetzt

4.1.4.2 Zeitliches Auftreten eines CPE

Die Ergebnisse der Virusisolierungen in konfluenten HEF-Kulturen aus den verschiedenen Organen sind für jedes Virus in der Tabelle 12 zusammengefaßt. Zytopathische Veränderungen traten in Abhängigkeit von Isolat und Art des inokulierten Organmaterials nach 1 bis 5, bei dem aus dem Gewebematerial eines Kloakenpapilloms isolierten Virus 279/00 nach 9 Tagen, d.h. 2 Tage nach Subkultivierung in der 2. Passage auf. Bei Proben von Herz und Lunge war der zeitliche Abstand zwischen Verimpfung des virushaltigen Organmaterials und erstmaligem Auftreten eines CPE am kürzesten, bei Darm- und Gehirnproben dauerte es am längsten, bis mikroskopisch Veränderungen in den Zellkulturen sichtbar wurden (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens (Tage p.i.) der zytopathischen Veränderungen in Abhängigkeit von Organmaterial und Isolat

Isolat Nr.	Tage p. i. bis zum erstmaligen Auftreten des CPE							
	Herz	Leber	Milz	Darm ²	Niere	Ge- hirn ³	Lunge	Sonsti- ge
3112/97	2	2	2	3	2	3	n.u.	n.u.
2753/98	2	4	-	-	-	-	n.u.	n.u.
862/98	2	3	2	-	-	-	n.u.	n.u.
564/99	3	-	3	4	-	-	2	n.u.
2009/99	2	2	2	2	2	3	2	n.u.
2490/00	1	2	2	2	2	5	n.u.	n.u.
279/00	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	9 ¹
180/01	2	2	-	-	4	-	2	n.u.
181/01	2	-	-	3	-	-	2	n.u.
661/01	1	1	1	2	1	3	1	n.u.
663/01	1	1	1	1	2	2	1	n.u.
670/01	1	1	2	2	2	2	1	n.u.
54/01	3	-	3	-	3	-	n.u.	n.u.
131/01	-	1	2	-	2	-	n.u.	n.u.
MW	1,8	1,9	2,0	2,4	2,2	3,0	1,6	9

Legende zur Tabelle 13:

-: kein sichtbarer CPE im gesamten Beobachtungszeitraum

n. u.: nicht untersucht

¹: Sonstige Organe - Kloakenpapillom

²: Darm: es wurde Ileum verwendet

³: Gehirn: es wurde Stammhirn eingesetzt

4.1.4.3 Aussehen des CPE in HEF-Kulturen

Während der Anzucht und Vermehrung der 14 neuen Virusisolate wurden die infizierten HEF-Kulturen täglich morgens und abends bis zum 7. Tag p.i. (bzw. bis zum 12. Tag p.i. beim Isolat 279/00) auf das Auftreten sowie auf Art und Morphologie von zytopathischen Effekten untersucht. Dabei wurden die Ausbreitungsgeschwindigkeit und das Aussehen der Zellkulturveränderungen an Tag 2, 3 und 5 dokumentiert bzw. an Tag 9, 10 und 12 bei Isolat Nr. 279/00, wobei bei allen Isolaten schon wenige Tage nach erstmaligem Auftreten des CPE der Zellrasen fast vollständig verändert bzw. zerstört war (vgl. Tabelle 14). Um die für eine vergleichende Beurteilung notwendigen einheitlichen Voraussetzungen zu schaffen, wurde von jedem Isolat die 8. Passage in HEF-Kulturen (Zellzahl bei Einsaat: 5×10^5 Zellen/ml) in einer Infektionsdosis von ca. $10^{5,5}$ bis $10^{6,0}$ (bzw. $10^{4,2}$ bei Isolat 279/00) eingesetzt.

Es wurde stets zuerst die Ausbildung von herdförmigen Arealen mit in der Größe variierenden, mehr oder weniger verschieden abgerundeten Zellen beobachtet, die sich nach 1 bis 2 Tagen über den gesamten Zellrasen ausgebreitet und dann aus dem Zellverband gelöst hatten. Bei einigen Isolaten traten in den frühen Infektionsstadien vermehrt Synzytien auf. Bei den Isolaten 564/99, 180/01, 181/01, 661/01, 663/01, 670/01 und 54/02 kam es über den gesamten Beobachtungszeitraum zur Ausbildung von Synzytien. In den späteren Infektionsstadien wurde bei jedem Isolat ein lytischer CPE beobachtet. Zellkerneinschlüsse waren mit der im Umkehrmikroskop höchstmöglichen Vergrößerung von 1:250 nicht erkennbar.

Tabelle 14: Morphologie und Ausbreitungsgeschwindigkeit der zytopathischen Veränderungen der 14 neuen Virusisolate in HEF-Kulturen

Isolat Nr.	Ausbreitungsgeschwindigkeit des CPE ¹	Morphologie der Zellveränderungen		
		Tag 2	Tag 3	Tag 5
3112/97	schnell	herdförmige Areale sehr kleiner, abgekugelter Zellen sowie vereinzelt kleine Synzytien	kleine runde Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt	Zellrasen zu ca. 60% zerstört, massenweise abgerundete Zellen im Überstand
2753/98	mäßig	keine morphologischen Veränderungen sichtbar	Plaquetförmiges Auftreten kleiner abgerundeter Zellen sowie kleine Synzytien	Plaques größer und über den gesamten Zellrasen verteilt, Zelllyse im Plaquetzentrum, kleine Synzytien
862/98	mäßig	keine morphologischen Veränderungen sichtbar	vereinzelt Herde sehr kleiner abgekugelter Zellen	multiple Auftreten von Herden mit kleinen abgekugelten Zellen, kleine Synzytien
564/99	schnell	herdförmige Areale mit großen abgekugelten Zellen, Synzytien	ca. 70-80% aller Zellen verändert, Herauslösen der großen abgerundeten Zellen und Synzytien mit Löcherbildung im Zellrasen	Zellrasen größtenteils zerstört, massenhaft große runde Zellen und Synzytien im Überstand, nur noch wenige abgerundete Fibroblasten bilden am Boden des Kulturgefäßes ein löchriges Netz

Isolat Nr.	Ausbreitungsgeschwindigkeit des CPE ¹	Morphologie der Zellveränderungen		
		Tag 2	Tag 3	Tag 5
2009/99	mäßig bis schnell	vereinzelte herdförmige Areale mit kleinen, abgekugelten Zellen, kleine Synzytien	Vergrößerung und Konfluieren der Plaques mit zentraler Zelllyse	kleine runde Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt, z.T Lösung aus dem Zellverband und Lyse, vereinzelt abgekugelte Zellen und Synzytien im Überstand
2490/00	mäßig bis schnell	vereinzelte herdförmige Areale mit mit kleinen, abgekugelten Zellen, kleine Synzytien	Vergrößerung und Konfluieren der Plaques mit zentraler Zelllyse	kleine runde Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt mit Lösung aus dem Zellverband und Lyse, vereinzelt abgekugelte Zellen und Synzytien im Überstand
279/00 ²	langsam	keine morphologischen Veränderungen sichtbar	vereinzelte Nesterbildung von kleinen runden Zellen	kleine runde Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt, z.T Lösung aus dem Zellverband und Lyse
180/01	schnell	vor allem kleine runde Zellen diffus über den Zellrasen verteilt, kleine Synzytien über den gesamten Beobachtungszeitraum	Vergrößerung und Konfluieren der Plaques mit zentraler Zelllyse	kleine runde Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt mit Lösung aus dem Zellverband und Lyse

Isolat Nr.	Ausbreitungsgeschwindigkeit des CPE ¹	Morphologie der Zellveränderungen		
		Tag 2	Tag 3	Tag 5
181/01	mäßig bis schnell	vor allem kleine runde Zellen, erst herdförmig, dann diffus über den Zellrasen verteilt, kleine Synzytien über den gesamten Beobachtungszeitraum	Vergrößerung und Konfluieren der Plaques mit zentraler Zelllyse	kleine runde Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt mit Lösung aus dem Zellverband und Lyse
661/01	sehr schnell	große abgerundete Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt, Synzytien während des gesamten Beobachtungszeitraumes	ca. 70-80% aller Zellen verändert, Herauslösen der großen abgerundeten Zellen und Synzytien mit Löcherbildung im Zellrasen	Zellrasen vollständig zerstört, massenhaft große runde Zellen und Synzytien im Überstand, nur noch wenige abgerundete Fibroblasten haften netzförmig am Boden des Kulturgefäßes
663/01	sehr schnell	große abgerundete Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt, Synzytien während des gesamten Beobachtungszeitraumes	ca. 70-80% aller Zellen verändert, Herauslösen der großen abgerundeten Zellen und Synzytien mit Löcherbildung im Zellrasen	Zellrasen vollständig zerstört, massenhaft große runde Zellen und Synzytien im Überstand, nur noch wenige abgerundete Fibroblasten haften netzförmig am Boden des Kulturgefäßes

Isolat Nr.	Ausbreitungsgeschwindigkeit des CPE ¹	Morphologie der Zellveränderungen		
		Tag 2	Tag 3	Tag 5
670/01	sehr schnell	große abgerundete Zellen diffus über den gesamten Zellrasen verteilt, Synzytien während des gesamten Beobachtungszeit-raumes	ca. 70-80% aller Zellen verändert, Herauslösen der großen abgerundeten Zellen und Synzytien mit Löcherbildung im Zellrasen	Zellrasen vollständig zerstört, massenhaft große runde Zellen und Synzytien im Überstand, nur noch wenige abgerundete Fibroblasten haften netzförmig am Boden des Kulturgefäßes
54/01	schnell	herdförmige Areale mit großen runden Zellen und Synzytien	diffuse Verteilung des CPE über den gesamten Zellrasen mit Löcherbildung und Herauslösung der Synzytien	starker lytischer CPE, Zellrasen zu ca. 70% zerstört, massenhaft runde Zellen und Synzytien im Überstand
131/01	schnell	herdförmiges Auftreten sehr kleiner, runder Zellen, kleine Synzytien	diffuse Verteilung der runden Zellen über den gesamten Zellrasen	Zellrasen zu ca. 60% zerstört, alle verbleibenden Zellen klein und abgerundet

Legende zur Tabelle 14:

¹Charakterisierung der Ausbreitungsgeschwindigkeit:

sehr schnell: Zeitraum zwischen erstmaligem Auftreten eines CPE (herdförmiger Plaque) und Ausbreitung über den gesamten Zellrasen bis hin zur Lyse <1 Tag

schnell: Zeitraum zwischen erstmaligem Auftreten eines CPE (herdförmiger Plaque) und Ausbreitung über den gesamten Zellrasen bis hin zur Lyse ca. 1 Tag

mäßig: Zeitraum zwischen erstmaligem Auftreten eines CPE (herdförmiger Plaque) und Ausbreitung über den gesamten Zellrasen bis hin zur Lyse ca. 2 Tage

langsam: Zeitraum zwischen erstmaligem Auftreten eines CPE (herdförmiger Plaque) und
Ausbreitung über den gesamten Zellrasen bis hin zur Lyse >2 Tage;

²: Isolat 279/00: Zytopathische Effekte wurden an Tag 9, 10 und 12 dokumentiert

4.2 Serologische Untersuchungen

4.2.1 Herstellung von Hyperimmunseren in Kaninchen

4.2.1.1 Virusanreicherung und Reinigung mit Polyethylenglycol

Während der Durchführung des Verfahrens nach LANCZ (1973, vgl. auch Punkt 3.2.2.1) wurden zur Kontrolle der Entwicklung der Infektiositätstiter die jeweils verschiedenen, im Laufe der Virusreinigung und –anreicherung erhaltenen Überstände Ü 1 bis Ü6 in HEF-Kulturen titriert. Die hierbei ermittelten Virustiter (bezogen auf jeweils 25 µl der titrierten Überstände) sind in der Tabelle 15 angegeben. Tabelle 16 zeigt den prozentualen Verlauf der errechneten Werte für jeden Überstand im Verhältnis zum Ursprungstiter der eingesetzten Virussuspensionen (Überstand 1 entspricht 100 %).

Tabelle 15: Entwicklung der Infektiositätstiter im Verlauf der Virusreinigung und – anreicherung mit Polyethylenglycol 6000

Isolat-Nr.	Titer (\log_{10} GKID ₅₀ /25 μ l) der Überstände					
	Ü1	Ü2	Ü3	Ü4	Ü5	Ü6
KS 144/79	6,9	5,9	7,0	6,1	5,7	6,0
6840/87	7,0	6,4	7,5	7,0	5,6	6,5
3115/88	6,1	5,6	7,3	6,7	5,7	6,0
1483/92	5,3	4,5	5,3	5,7	4,2	4,7
8326/87	6,9	5,7	6,2	5,8	5,1	5,6
279/00	5,6	4,9	6,5	5,8	5,7	5,7

Tabelle 16: Prozentualer Verlauf der Infektiositätstiter der Überstände bezogen auf Ü1 (100%)

Isolat-Nr.	Vergleich der Überstände in Prozent von Ü1					
	Ü1%	Ü2%	Ü3%	Ü4%	Ü5%	Ü6%
KS 144/79	100	85,5	101,4	88,4	82,6	87,0
6840/87	100	91,4	107,1	100	80,0	92,8
3115/88	100	91,8	119,7	109,8	93,4	98,3
1483/92	100	84,9	100	107,5	79,2	88,7
8326/87	100	82,6	89,9	84,1	73,9	84,1
279/00	100	87,5	116,1	103,6	101,8	101,8

4.2.1.2.1 Antikörperkinetik nach Immunisierung der Kaninchen

Zur Herstellung von Hyperimmunseren wurde jedes Kaninchen 3 mal im Abstand von 4 Wochen mit der gereinigten und adjuvantierten Antigensuspension (Ü6) immunisiert (siehe Punkt 3.2.2.2). Die Blutentnahmen zur Gewinnung der Hyperimmunseren erfolgten unmittelbar vor der ersten Immunisierung (Tag 0), 2 Wochen nach der zweiten (Tag 45) sowie 2 bzw. 4 Wochen (Tag 75 bzw. 90) nach der dritten Impfung. Tabelle 17 zeigt den Antikörperstatus der Kaninchen zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen, wobei die Seren auf neutralisierende Antikörper gegen das jeweilige zur Immunisierung eingesetzte PsHV-Isolat untersucht wurden. Die in der Tabelle 17 dargestellten Titerergebnisse ergeben sich aus den gerundeten geometrischen Mittelwerten von jeweils an drei verschiedenen Tagen durchgeführten Neutralisationstesten (vgl. Tabelle 20). Bei allen Kaninchen waren die vor der ersten Impfung gewonnenen Seren frei von Antikörpern gegen das homologe Virusisolat. Es konnten bei diesen Seren außerdem in keinem Fall Antikörper gegen die bei den jeweils übrigen Kaninchen verimpften 5 PsHV-Isolate nachgewiesen werden, so dass die derart getesteten Seren aller Tiere vom Tag 0 gepoolt wurden und in den Neutralisations- und Kreuzneutralisationstesten sowie im Western Blot als Negativkontrollen dienten. Geschwindigkeit und Höhe des Antikörpertiters variierten von Tier zu Tier. Die höchsten Titer fanden sich mit Ausnahme von Kaninchen Nr. 4 bei allen Tieren in den nach der dritten Immunisierung am Tag 90 gewonnenen Seren. Bei Kaninchen Nr. 4 (Impfvirus 1483/92) war nach der dritten Impfung kein Titeranstieg mehr messbar. Von diesem Tier wurde aus diesem Grunde das am Tag 75 gewonnene Antiserum in den Kreuzneutralisationstesten und im Western Blot verwendet. Bei allen anderen Tieren gelangte das Antiserum vom Tag 90 zum Einsatz. Die mangelhafte Antikörperproduktion bei Tier Nr. 4 ist evtl. auf eine mit einer Nierenfunktionsstörung einhergehende Krankheit zurückzuführen, da bei diesem Kaninchen während des Versuchszeitraumes eine Störung des Allgemeinbefindens mit Polydipsie/Polyurie sowie vermindertem Appetit, Gewichtsverlust und stumpfem, schuppigem Fell beobachtet wurde. Das Tier wurde ca. 3 Wochen nach Versuchsende tot in seinem Käfig aufgefunden. Es wurde keine Sektion durchgeführt, so dass über die genaue Todesursache keine Aussage getroffen werden kann.

Tabelle 17: Antikörperkinetik der immunisierten Kaninchen

Kaninchen-Nr.	Zur Immunisierung ¹ verwendetes PsHV-Isolat	<i>VN log₂-Titer in Tagen p.vacc.</i>			
		0	45	75	90
1	KS 144/79	<1,0	4,3	7,0	10,0
2	6840/87	<1,0	4,0	7,7	9,0
3	3115/88	<1,0	2,0	6,7	7,0
4	1483/92	<1,0	4,0	4,0	3,3
5	8326/87	<1,0	2,3	8,3	8,0
6	279/00	<1,0	5,0	8,0	10,3

Legende zur Tabelle 17:

¹: Immunisierungen erfolgten am Tag 0, 30 und 60

4.2.1.2.2 Neutralisationstests in HEF-Kulturen

Es wurden die unter Punkt 3.1.1.1 in Tabelle 3 aufgelisteten 14 neuen sowie die unter Punkt 3.1.1.2 in Tabelle 4 genannten sonstigen Virusisolate gegen die 6 in Kaninchen produzierten Hyperimmunseren getestet, wobei die Antiseren Nr. 1 bis 5 entsprechend der serologischen Einteilung nach GRAVENDYCK et al. (1996) als Referenzseren für die bisher bekannten Subtypen gelten (vgl. auch Punkt 3.1.1.3). In den Tabellen 18a und 19a sind die Ergebnisse der Neutralisationstests als Titer in log₂ dargestellt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die geometrischen Mittelwerte aus jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurden bis zu 6 Wiederholungen der Titration vorgenommen, um Fehler bei der Testdurchführung ausschließen und reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können. Auflistungen der einzelnen Ergebnisse dieser Wiederholansätze finden sich in den Tabellen 18b und 19b. Die gefundene Streuung dieser Einzelergebnisse um den

Mittelwert (=Standardabweichung) variiert von 0 bis 1,73. Die aus den einzelnen Titrationsergebnissen errechneten Variationskoeffizienten ($V_k = s/m * 100$, mit s = Standardabweichung und m =Mittelwert der Stichprobe) liegen zwischen 0% und 43,3%.

Tabelle 18a: Ergebnisse der Neutralisationstests (geometrische Mittelwerte der Antikörpertiter in \log_2) gegen die 14 neuen PsHV-Isolate (vgl. Tabelle 3)

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
KS 144/79	10,0					
6840/87		9,0				
3115/88			7,0			
1483/92				4,0		
8326/87					8,0	
3112/97	6,0	3,0	3,0	4,6	7,3	<2,0
2753/98	7,3	3,7	3,4	4,8	6,7	4,0
862/98	7,3	4,3	7,0	3,3	7,3	9,7
564/99	5,3	8,7	4,3	>1,0	3,3	<2,0
2009/99	3,3	4,3	7,7	<1,0	<2,0	9,7
2490/00	3,7	5,3	7,0	<2,0	4,0	9,0
279/00	<2,0	<2,0	7,7	<1,0	2,3	10,3
180/01	6,7	4,0	4,0	4,0	7,7	4,0
181/01	5,7	4,0	4,0	4,3	8,0	3,3

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
661/01	5,0	8,7	5,0	<1,0	3,0	<2,0
663/01	5,7	9,0	4,0	2,7	3,0	3,3
670/01	4,0	9,3	4,0	2,3	4,0	<2,0
54/01	<2,0	8,0	4,0	<1,0	4,0	<1,0
131/01	9,0	4,0	5,3	<2,0	4,3	3,0

Tabelle 18b: Ergebnisse der einzelnen Wiederholansätze der Neutralisationstests (Antikörpertiter in log₂) gegen die 14 neuen Virusisolate (vgl. Tabelle 18)

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
KS 144/79	10 10 10					
6840/87		7 9 8				
3115/88			7 7 7			
1483/92				5 3 4		
8326/87					8 8 8	

Anti- serum	PsHV-1	PsHV-2	PsHV-3	PsHV-4	PsHV-5	PsHV-?
PsHV- Isolat Nr.	KS 144/79	6840/87	3115/88	1483/92	8326/87	279/00
3112/97	6 6 6	3 3 3	3 2 4	5 4 5 3 6	7 7 8	1 1 2
2753/98	7 8 7	3 4 4	3 4 3 4 3	4 4 6 5 5	6 7 7	4 4 4
862/98	7 7 8	4 5 4	8 7 9	3 3 4	7 8 7	9 10 10
564/99	5 4 4	9 8 9	3 4 3	0 1 1	3 2 2	2 2 1
2009/99	4 3 3	3 3 4	8 7 8	1 0 1	1 1 2	10 10 9
2490/00	4 3 4	6 5 5	7 7 7	2 1 2	3 5 4	9 9 9
279/00	2 1 1	2 2 1	8 8 7	0 0 1	2 3 2	10 10 11
180/01	7 7 6	4 4 4	4 4 4	4 5 3	7 8 7	5 3 4
181/01	6 6 5	4 4 4	4 4 4	4 3 4	8 8 8	5 2 3
661/01	7 3 5	10 8 8	5 5 5	1 2 1	3 3 3	2 1 1
663/01	5 7 5	11 8 9	2 4 6	3 2 3	4 3 2	5 3 2
670/01	4 4 4	10 9 10	6 3 3	1 4 2	4 4 4	1 2 1
54/01	2 2 1	7 10 7	4 4 4	0 1 1	4 4 4	1 1 1
131/01	8 9 10 9	4 4 4	6 5 6	2 1 1	5 4 4	3 3 3

Tabelle 19a: Ergebnisse der Neutralisationstests (geometrische Mittelwerte der Antikörpertiter in \log_2) gegen die 31 sonstigen Virusisolate (vgl. Tabelle 4)

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
6090/82	5,7	<1,0	<2,0	3,7	7,3	<2,0
1639/87	<1,0	<2,0	7,3	2,7	3,0	9,3
1674/87	10,0	5,0	4,0	<1,0	4,3	5,0
6733/87	<2,0	8,7	3,7	<1,0	<2,0	2,7
6896/87	<1,0	8,3	<1,0	<2,0	4,0	<2,0
6908/87	2,3	9,0	<2,0	<1,0	<2,0	<1,0
5376/88	9,0	3,0	<2,0	2,3	3,0	<2,0
6058/89	9,3	3,0	3,0	<2,0	3,0	<2,0
7077/89	9,7	4,0	3,3	<2,0	3,3	3,3
7129/89	9,0	4,0	4,0	<1,0	3,0	3,6
1979/90	9,0	4,7	3,7	<2,0	4,0	6,0
2864/90	3,0	4,0	7,3	<1,0	<1,0	10,7
3042/90	<2,0	<1,0	3,3	4,0	7,3	3,7
5174/90	3,3	<2,0	<2,0	4,0	7,3	<2,0
5092/91	10,3	5,0	3,7	<2,0	4,3	4,7
1613/92	9,0	<1,0	<1,0	<1,0	4,7	3,7
2609/92	4,3	<1,0	<2,0	3,7	6,0	<1,0
2384/92	<1,0	<2,0	7,7	<2,0	<1,0	9,7
1587/92	5,7	3,3	<2,0	4,0	6,7	<2,0
1071/93	<1,0	8,7	3,3	<1,0	<2,0	<2,0
1606/94	<2,0	9,3	2,3	<2,0	<1,0	<2,0
2335/94	<2,0	<2,0	7,7	<1,0	3,3	10,3
4739/94	4,0	4,0	7,0	<1,0	<2,0	10,0
5139/94	<2,0	<1,0	7,3	2,3	<1,0	10,7

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
5192/94	<1,0	<2,0	7,7	<1,0	3,7	10,3
1257/95	10,7	5,0	3,0	<2,0	3,7	4,7
1277/95	<1,0	9,0	2,7	<1,0	<2,0	3,0
1987/95	<1,0	<2,0	<2,0	4,0	6,7	3,3
2162/95	3,0	<1,0	<1,0	4,0	7,0	<2,0
2685-20/95	<2,0	<1,0	<2,0	4,3	7,7	3,3
4133/95	3,3	8,3	3,0	<1,0	<2,0	3,0

Tabelle 19b: Ergebnisse der einzelnen Wiederholansätze der Neutralisationstests (Antikörpertiter in log₂) gegen die 31 sonstigen Virusisolate (vgl. Tabelle 19)

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
6090/82	5	0	1	3	7	2
	6	1	1	4	7	1
	6	1	2	4	8	2
1639/87	1	1	8	3	3	9
	0	2	7	2	3	10
	1	1	7	3	3	9
1674/87	10	5	4	1	6	5
	10	5	4	0	4	5
	10	5	4	1	5	5
					3	5
6733/87	2	8	4	1	4	
	2	7	3	0	2	2
	1	8	4	1	1	3

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
6896/87	0 0 0	8 10 7 8	1 1 0	1 1 2	4 4 4	2 2 1
6908/87	2 3 2	11 7 9 9 9	1 2 1	0 0 1	2 2 1	1 1 0
5376/88	9 9 9	3 5 1 3 3	2 1 1	3 2 2	3 3 3	1 1 2
6058/89	9 11 9 9 9 9	3 5 1 3	3 3 3	2 1 1	3 3 3	1 2 1
7077/89	9 10 10	4 4 4	3 4 3	2 1 2	3 4 3	3 5 3 2 4 3
7129/89	9 9 9	4 4 4	4 4 4	1 1 0	3 3 3	3 5 3 3 4
1979/90	9 9 9	4 5 5	3 4 4	2 1 2	4 4 4	6 6 6
2864/90	3 3 3	4 4 4	7 8 7	0 1 0	1 0 1	11 10 11
3042/90	2 1 1	1 0 1	3 4 3	4 4 4	7 8 7	3 4 4
5174/90	3 4 3	2 1 2	2 1 1	4 4 4	8 7 7	2 1 1

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
5092/91	10 11 10	5 5 5	3 4 4	2 1 2	4 6 4 4 4 4	4 5 5
1613/92	9 9 9	1 0 1	1 0 1	1 0 1	5 5 4	3 4 4
2609/92	4 3 3	1 0 0	2 1 1	4 4 3	6 6 6	0 0 0
2384/92	0 0 0	1 2 1	7 9 7	2 1 2	1 1 0	9 10 10
1587/92	5 7 5	3 4 3	2 1 2	4 4 4	6 7 7	2 1 2
1071/93	0 0 1	8 9 9	3 4 3	0 0 1	2 2 1	2 1 2
1606/94	2 2 1	9 10 9	2 3 2	2 1 2	1 0 1	2 1 2
2335/94	2 2 0	2 2 1	7 8 8	1 0 0	3 4 3	10 11 10
4739/94	4 4 4	4 4 4	7 7 7	1 1 0	2 1 2	10 10 10
5139/94	2 1 2	2 0 0	7 7 8	2 2 3	1 1 0	10 12 11 10 11 10
5192/94	0 0 1	2 2 1	7 8 8	0 0 0	3 5 4 3	10 11 10

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00
1257/95	10	5	3	1	4	5
	12	5	3	1	3	5
	10	5	3	2	4	4
1277/95	1	9	3	1	2	3
	1	9	3	1	2	3
	0	9	2	0	1	3
1987/95	0	2	2	4	6	2
	0	2	2	6	8	4
	0	1	1	2	6	4
				4		
2162/95	3	1	1	4	7	2
	3	0	0	4	7	2
	3	0	0	4	7	1
2685-20/95	2	1	2	4	7	3
	2	1	1	3	9	3
	1	0	2	3	7	4
4133/95			3			
	3	8	5	1	2	3
	3	9	1	0	2	3
	4	8	3	0	1	3
			3			

4.2.1.2.3 PK-Werte

Aus den in den Tabellen 18 und 19 aufgelisteten Ergebnissen der Neutralisationstests wurden die serologischen Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Isolate zueinander mittels der prozentualen Neutralisationskapazität (PK-Wert) beurteilt (nach HERBST, 1983). Für jedes im Neutralisationstest untersuchte PsHV-Isolat wurde der PK-Wert berechnet (Tabelle 20 und 21, vgl. auch Punkt 3.2.1.5).

Die Beurteilung der serologischen Verwandtschaftsgrade erfolgte nach der Einteilung von GIAMBRONE und SOLANO (1988):

PK-Werte: 0-30: nicht verwandt

31-70: verwandt

>70: identisch

Demnach lassen sich die im Neutralisationstest untersuchten PsHV-Isolate nach Auswertung der PK-Werte den in der letzten Spalte der Tabellen 20 und 21 angegebenen serologischen Subtypengruppen zuordnen. Es fällt dabei auf, daß es drei Isolate gibt, die sich nicht eindeutig einem der 5 bekannten serologischen Subtypen zuordnen lassen. Bei den in der Tabelle 21 aufgelisteten 14 neuen Isolatgruppen handelt es sich hierbei um das Isolat 3112/97 und um die während desselben PPD-Ausbruches aus zwei verschiedenen Tieren isolierten Viren 180/01 und 181/01, die sich beide sowohl dem Subtyp PsHV-4 als auch PsHV-5 zuordnen lassen. Bei den 31 sonstigen Isolatgruppen (Tabelle 22) sind acht Virusisolate (Tagebuch-Nr. 6090/82, 3047/90, 5180/90, 2609/92, 1585/92, 1987/95, 2162/95 und 2685-20/95) mit PsHV-4 und PsHV-5 gleich nahe verwandt. Alle anderen 23 Isolate können eindeutig einem Subtyp zugeordnet werden. Tabelle 23 zeigt die Anzahl der Isolate je Subtyp sowie die relative Häufigkeit der Subtypen in Prozent getrennt für jede Isolatgruppe und für die Gesamtzahl aller Isolate. Die Häufigkeit der Verteilung der Isolate auf die verschiedenen Subtypen wird in den Abbildungen 6, 7 und 8 graphisch dargestellt.

Tabelle 20: PK-Werte aus den Neutralisationstitern der 14 neuen Isolate und Zuordnung zu den bisher bekannten serologischen Subtypen unter Verwendung der Einteilung nach GIAMBRONE und SOLANO (1988) (Werte ≥ 70 sind fett gedruckt)

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00	Sero- logische Einteilung
3112/97	60	33	43	115	91	<19	PsHV-4 o.-5
2753/98	73	41	49	120	83,7	39	PsHV-4 o. 5
862/98	67	48	100	83	91	94	PsHV-3
564/99	53	97	<29	<25	41	<19	PsHV-2
2009/99	33	48	110	<25	<25	94	PsHV-3
2490/00	37	59	100	<50	50	87	PsHV-3
279/00	<20	<22	110	<25	28	100	PsHV-3
180/01	67	44	57	100	96	39	PsHV-4 o.-5
181/01	57	44	57	108	100	32	PsHV-4 o.-5
661/01	50	97	47	<25	38	<19	PsHV-2
663/01	57	100	57	68	38	32	PsHV-2
670/01	40	103	57	58	50	<19	PsHV-2
54/01	<20	89	57	<25	50	<10	PsHV-2
131/01	90	44	47	<50	54	29	PsHV-1

Tabelle 21: PK-Werte aus den Neutralisationstitern der 31 sonstigen Isolate und Zuordnung zu den bisher bekannten serologischen Subtypen unter Verwendung der Einteilung nach GIAMBRONE und SOLANO (1988) (Werte ≥ 70 sind fett gedruckt)

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00	Sero- logische Einteilung
6090/82	57	<11	<29	93	91	<19	PsHV-4 o.-5
1639/87	<10	<22	104	68	38	90	PsHV-3
1674/87	100	56	57	<25	54	49	PsHV-1
6733/87	<20	97	53	<25	<25	26	PsHV-2
6896/87	<10	92	<14	<50	50	<19	PsHV-2
6908/87	23	100	<29	<25	<25	<10	PsHV-2
5376/88	90	33	<29	58	38	<19	PsHV-1
6058/89	93	33	42	<50	38	<19	PsHV-1
7077/89	97	44	47	<50	41	32	PsHV-1
7129/89	90	44	57	<25	38	35	PsHV-1
1979/90	90	52	53	<50	50	58	PsHV-1
2864/90	30	44	104	<25	<13	104	PsHV-3
3042/90	<20	<11	47	100	91	36	PsHV-4 o.-5
5174/90	33	<22	<29	100	91	<19	PsHV-4 o.-5
5092/91	103	55	<53	<50	54	45,6	PsHV-1
1613/92	90	<11	<14	<25	59	36	PsHV-1
2609/92	43	<11	<29	93	75	<10	PsHV-4 o.-5
2384/92	<10	<22	110	<50	<13	94	PsHV-3
1587/92	57	37	<29	100	84	<19	PsHV-4 o.-5
1071/93	<10	97	47	<25	<25	<19	PsHV-2
1606/94	<20	103	33	<50	<13	<19	PsHV-2
2335/94	<20	<22	110	<25	41	100	PsHV-3
4739/94	40	44	100	<25	<25	97	PsHV-3

Anti- serum PsHV- Isolat Nr.	PsHV-1 KS 144/79	PsHV-2 6840/87	PsHV-3 3115/88	PsHV-4 1483/92	PsHV-5 8326/87	PsHV-? 279/00	Sero- logische Einteilung
5139/94	<20	<11	104	58	<13	104	PsHV-3
5192/94	<10	<22	110	<25	46	100	PsHV-3
1257/95	107	56	43	<50	46	46	PsHV-1
1277/95	<10	100	39	<25	<25	29	PsHV-2
1987/95	<10	<22	<29	100	84	32	PsHV-4 o.-5
2162/95	30	<11	<14	100	88	<19	PsHV-4 o.-5
2685-20/95	<20	<11	<29	108	96	32	PsHV-4 o.-5
4133/95	33	92	42,9	<25	<25	29	PsHV-2

Tabelle 22: Anzahl der Isolate je Subtyp und prozentuale Verteilung auf die einzelnen Subtypen im Verhältnis zur Gesamtzahl an Isolaten

	Neue Isolate		Sonstige Isolate		Isolate gesamt	
	Anzahl	Prozent %	Anzahl	Prozent %	Anzahl	Prozent %
PsHV-1	1	7,0	9	28	10	22
PsHV-2	5	35	7	23	12	27
PsHV-3	4	29	7	23	11	24
PsHV-4 o. 5	4	29	8	26	12	27
Gesamt	14	100	31	100	42	100

Abbildung 6: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der 14 neuen Isolate auf die 5 bekannten Subtypen

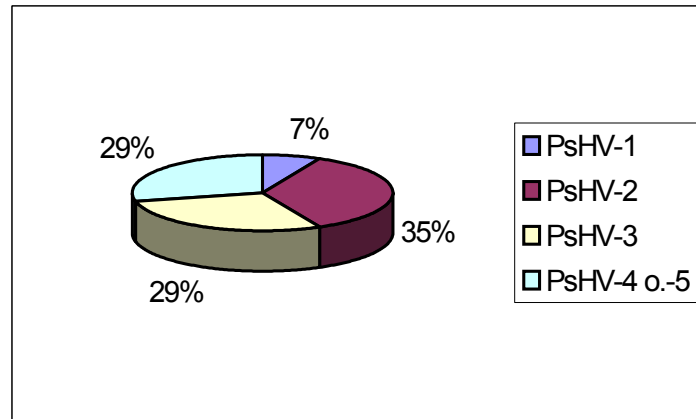


Abbildung 7: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der 31 sonstigen Isolate auf die 5 bekannten Subtypen

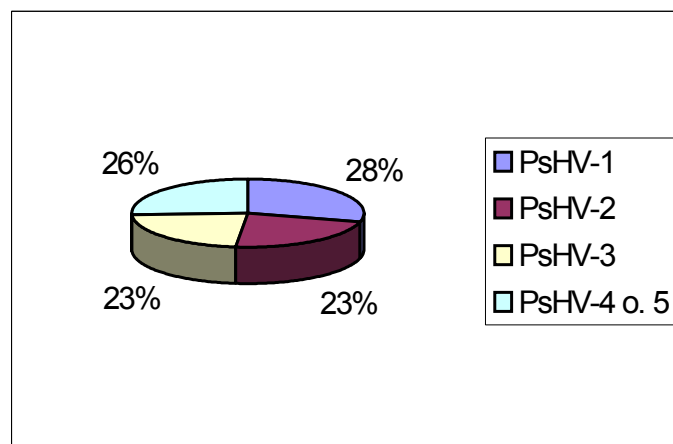
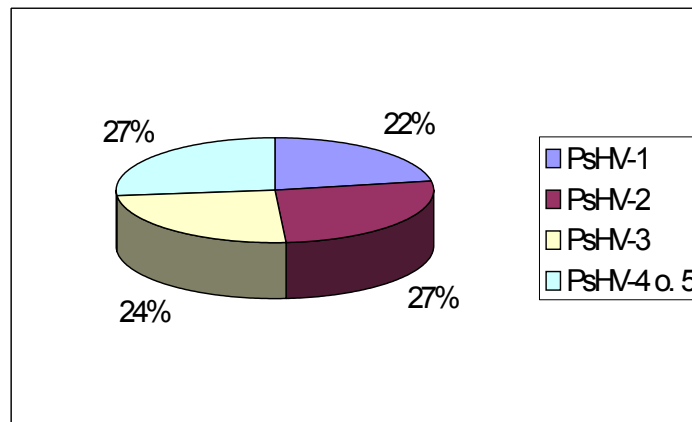


Abbildung 8: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung aller im Neutralisationstest untersuchten Isolate auf die 5 bekannten Subtypen



4.3 Restriktionsenzymanalyse

4.3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Von den unter Punkt 3.1.1.1 sowie 3.1.1.3 genannten Virusisolaten wurde DNA sowohl aus dem Zellpellet als auch aus dem Zellkulturüberstand extrahiert und der DNA-Gehalt in $\mu\text{g/ml}$ mit dem Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Bis auf Isolate 2753/98, 862/98 und 54/02 lag die Konzentration bei allen aus dem Zellkulturüberstand extrahierten DNA-Lösungen zwischen 80 und $150\mu\text{g/ml}$ und bei der aus dem Zellkultursediment gewonnenen DNA zwischen 150 und $300\mu\text{g/ml}$.

Bei den Isolaten 2753/98, 862/98 und 54/02 war der Gehalt an extrahierter DNA so gering (photometrische Messung der aus dem Überstand bzw. dem Sediment extrahierten DNA: zwischen 35,8 und $40,3\mu\text{g/ml}$ bzw. 64,4 und $72,5\mu\text{g/ml}$), dass nach der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente sich diese wiederholt nur äußerst undeutlich darstellten und nur bei Spaltung mit 2 Endonukleasen ein erkennbares Fragmentmuster entstand (vgl. auch Tabelle 25). Somit war bei diesen Isolaten ein Vergleich zu den anderen Isolaten nur eingeschränkt möglich.

Die aus dem Zellkulturüberstand und dem Zellkultursediment gewonnene Virus-DNA wurde in den Vorversuchen mit Restriktionsendonukleasen gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Sauberkeit und Leuchtintensität der Banden geprüft. Die DNA aus dem Überstand zeigte regelmäßig sauberere und damit besser sichtbare Banden, da hier weniger Hintergrundfluoreszenz aus abgebauter zellulärer DNA vorhanden war. Aus diesem Grund wurde bei der Mehrzahl der Isolate die aus dem Zellkulturüberstand extrahierte DNA eingesetzt. In der Tabelle 24 sowie in den unter Punkt 4.3.2 dargestellten Abbildungen 9a bis 18b wird für jedes Isolat angegeben, ob der Zellkulturüberstand (Ü) oder das Zellpellet (P) zur Aufreinigung der viralen DNA verwendet wurde. Bei der mitgeführten Negativkontrolle wurde immer der Zellkulturüberstand zur DNA-Extraktion verwendet. Um den ursprünglichen Infektiositätstiter der eingesetzten Virussuspensionen sowie die erfolgreiche Konzentrierung der Virionen aus dem Überstand nach den beiden

Zentrifugationsschritten zu überprüfen, wurde für jedes der mittels Restriktionsenzymanalyse untersuchten Isolate der Überstand im Anschluß an den dreimaligen Gefriertau (Ü1) sowie die Überstände nach den beiden folgenden Zentrifugationen (Ü2 und Ü3) in HEF-Kulturen titriert (Tabelle 23).

Tabelle 23: Virusgehalt der nach den einzelnen Zentrifugationsschritten erhaltenen Überstände in GKID₅₀/ml

PsHV- Isolat Nr.	Ü1	Ü2	Ü3
KS 144/79	7,2	7,3	5,5
6840/87	6,8	6,5	5,0
3115/88	6,3	6,3	4,6
1483/92	6,9	7,0	5,0
8326/87	5,1	5,5	3,8
3112/97	6,6	6,5	4,0
2753/98	4,9	4,4	4,0
862/98	5,9	6,0	3,3
564/99	6,7	6,5	3,5
2009/99	7,0	7,0	4,6
2490/00	7,0	7,1	5,0
279/00	5,5	5,7	3,1
181/01	6,7	6,3	4,0
661/01	8,0	7,7	5,2
670/01	7,7	7,7	4,8
54/01	6,9	7,0	5,9
131/01	7,0	6,8	4,8

Führte ein Ansatz nicht zur gewünschten Aufspaltung, wurde das Isolat erneut angezüchtet und die virale DNA wie beschrieben aufgereinigt, wobei bei einigen Isolaten auch nach dreimaliger Wiederholung des kompletten Versuchsansatzes nicht bzw. nicht mit allen Enzym-DNA-Ansätzen ein auswertbares Spaltmuster dargestellt werden konnte. Bei den Isolaten 2753/98, 862/98 und 54/02 konnte mit nur 2 und bei den Isolaten 564/98 und 131/02 mit nur 3 Endonukleasen ein auswertbares Restriktionsmuster erzielt werden. Eine Übersicht über die Auswertbarkeit der Spaltmuster der einzelnen Isolate zeigt Tabelle 24.

Tabelle 24: Auswertbarkeit (+) der mittels Spaltung durch Restriktionsendonukleasen untersuchten Isolate (Spaltmuster gewonnen aus dem Zellpellet (P) bzw. dem Zellkulturüberstand (Ü) sind getrennt aufgeführt)

PsHV-Isolat Nr.		<i>EcoR</i> I	<i>BamH</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I
KS 144/79	Ü	+	+	+	-	+	+	-
	P	+	-	-	-	-	-	+
6840/87	Ü	+	+	-	-	-	-	+
	P	+	-	-	+	+	-	-
3115/88	Ü	-	+	-	+	+	-	+
	P	+	-	-	-	-	+	-
1483/92	Ü	+	+	+	+	-	-	-
	P	+	-	-	-	+	+	+
8326/87	Ü	+	+	-	+	+	+	+
	P	+	-	+	-	-	-	-
3112/97	Ü	-	+	-	+	+	-	+
	P	+	-	-	-	-	+	-
2753/98	Ü	-	-	-	-	-	-	+
	P	+	-	-	-	+	+	-

PsHV-Isolat Nr.		<i>EcoR</i> I	<i>BamH</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I
862/98	Ü	-	-	-	-	+	+	-
	P	-	-	-	-	-	-	-
564/99	Ü	-	+	-	+	-	-	-
	P	+	-	+	-	-	-	-
2009/99	Ü	+	+	+	-	+	-	-
	P	+	-	-	-	-	+	-
2490/00	Ü	+	-	-	+	+	+	+
	P	+	+	+	-	-	-	-
279/00	Ü	+	+	-	+	-	-	-
	P	-	-	-	-	+	-	+
180/01	Ü	+	-	-	+	-	+	-
	P	-	-	-	-	-	-	-
181/01	Ü	-	-	-	+	-	-	+
	P	-	-	-	-	-	-	-
661/01	Ü	+	+	+	+	-	+	+
	P	-	-	-	-	+	-	-
670/01	Ü	+	+	+	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-
54/01	Ü	-	-	-	+	-	-	+
	P	-	-	-	-	-	-	-
131/01	Ü	-	-	-	-	+	+	+
	P	-	-	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 24:

Ü: DNA wurde aus dem Zellkulturüberstand extrahiert

P: DNA wurde aus dem Zellpellet extrahiert

+: Spaltmuster auswertbar

-: Spaltmuster nicht auswertbar

Bei allen Spaltungen wurden auch Fragmente von einer Größe weit über 12 kb erzeugt, wobei mit Hilfe des verwendeten Ladders eine Längenschätzung dieser Fragmente zu ungenau war, um damit den gesamten kb-Wert jedes Isolates zu errechnen.

Der Hintergrund aus abgebauter zellulärer DNA wird von den hohen bis zu den niedrigen Kilobasenbereichen immer stärker und wirkt häufig störend bei der Erkennung des Bandenmusters der viralen DNA.

Bei allen Gelen waren die Restriktionsmuster, die mit DNA aus infizierten Zellen erhalten wurden, identisch mit denen von DNA aus infektiösem Zellkulturüberstand. Bei der Untersuchung von DNA aus nicht infizierten Zellen waren keine Banden sichtbar.

4.3.2 Ergebnisse der Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen

Nachfolgend sind jeweils auf der linken Seite die eingescannten und beschrifteten Fotos der Agarosegele sowie auf der rechten Seite die dazugehörigen schematisierten Darstellungen gezeigt, wobei letztere durch manuelle Markierung der einzelnen DNA-Banden auf dem eingescannten Foto und anschließendes Ausdrucken der markierten Darstellung als Schema ohne das Foto entstanden sind. Enzym-DNA-Ansätze, deren Spaltmuster aufgrund eines zu geringen DNA-Gehaltes oder einer zu starken Hintergrundfärbung nicht erkennbar war, sind in der schematisierten Darstellung als Lanes ohne Banden gezeichnet. Die Buchstaben Ü und P in den nachfolgend dargestellten Abbildungen 9a bis 18b kennzeichnen für jedes Isolat die Art der DNA-Aufreinigung und zeigen somit an, ob als Ausgangsmaterial zur Präparation der viralen DNA der Zellkulturüberstand (Ü) oder das Zellpellet (P) verwendet wurde.

Abbildung 9a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I

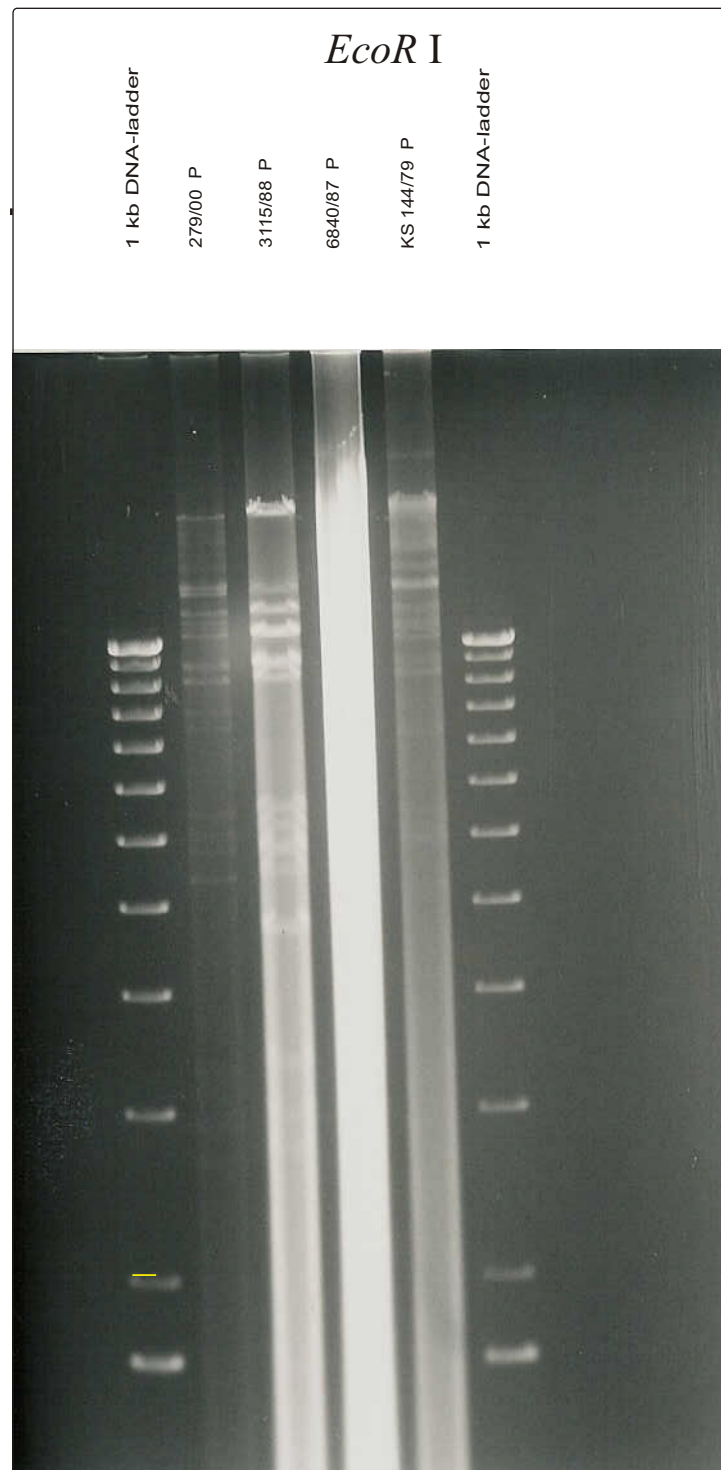


Abbildung 10a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III bzw. *Bam*HI

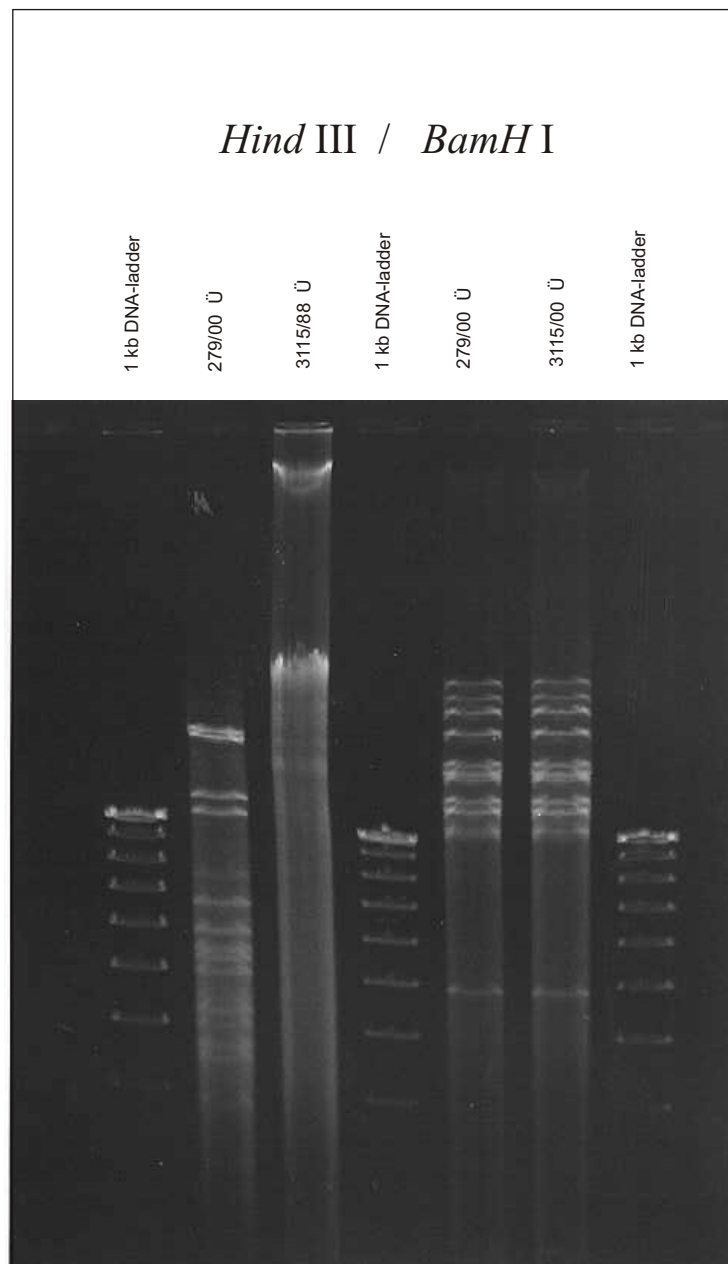


Abbildung 10b: Schematische Darstellung der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III bzw. *Bam*H I

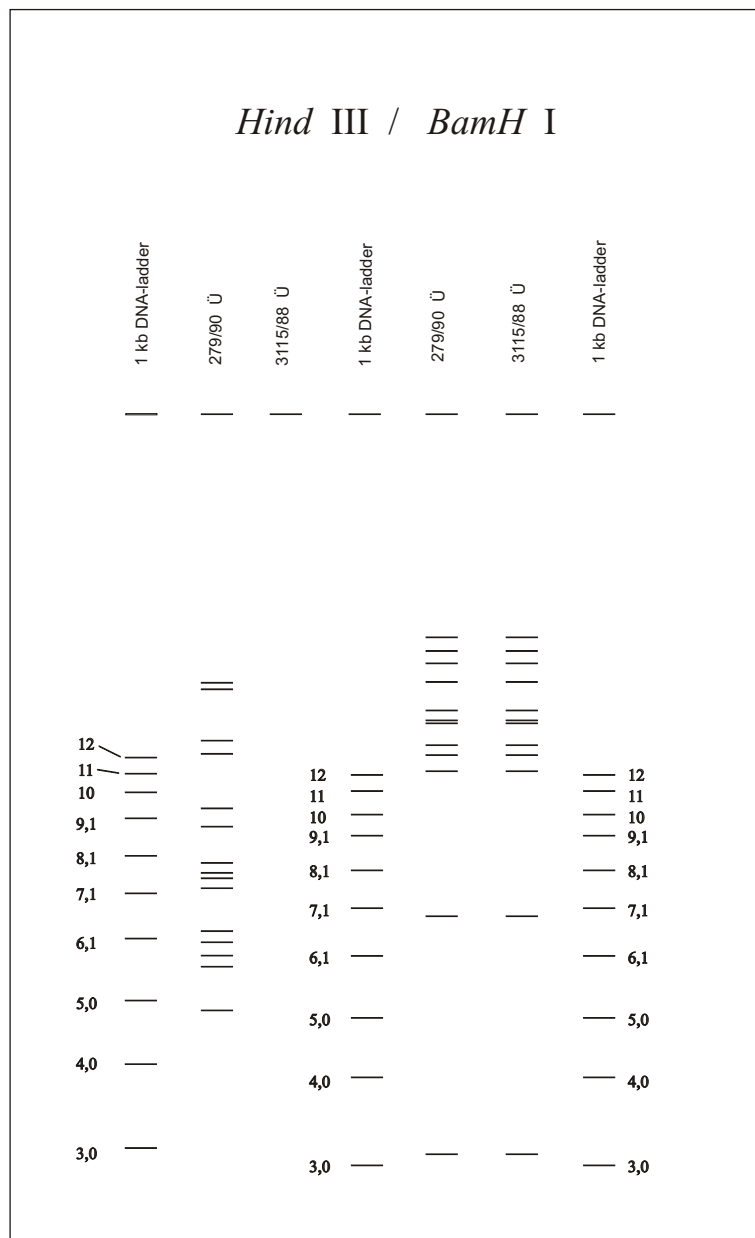


Abbildung 11a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *BamH* I

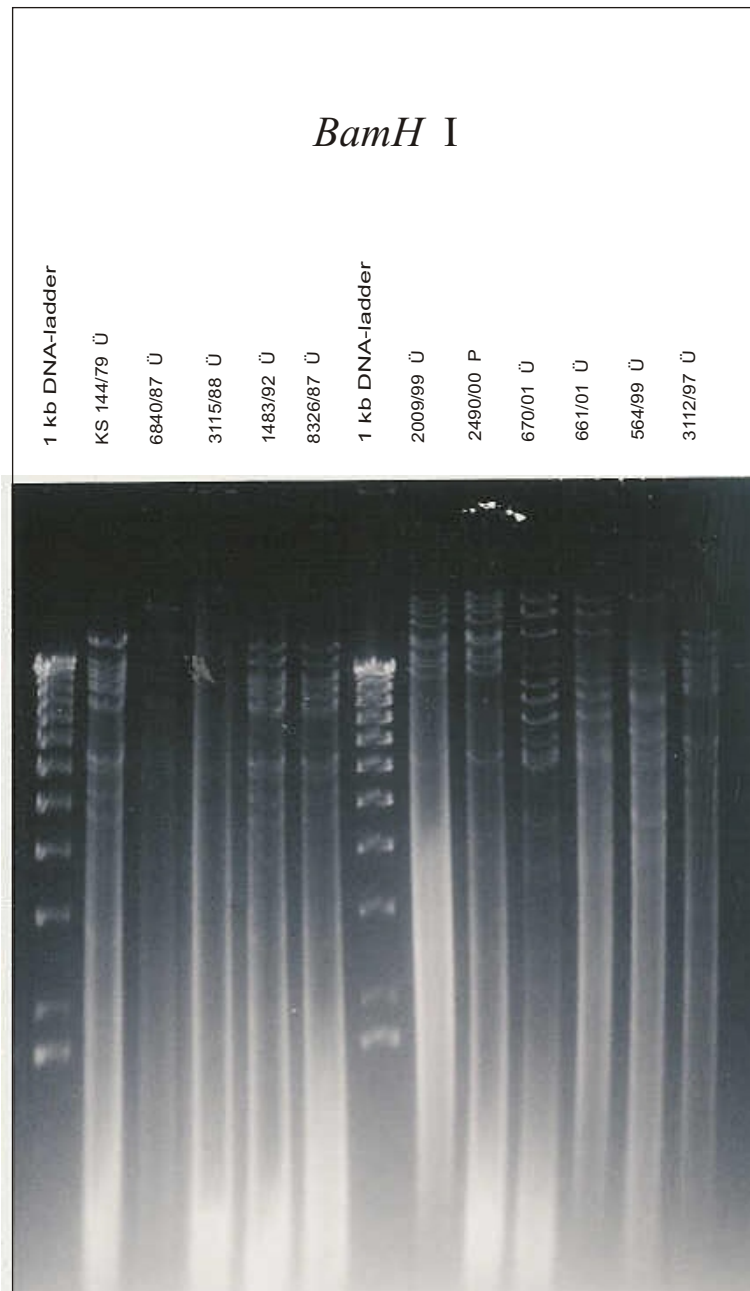


Abbildung 11b: Schematische Darstellung der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI

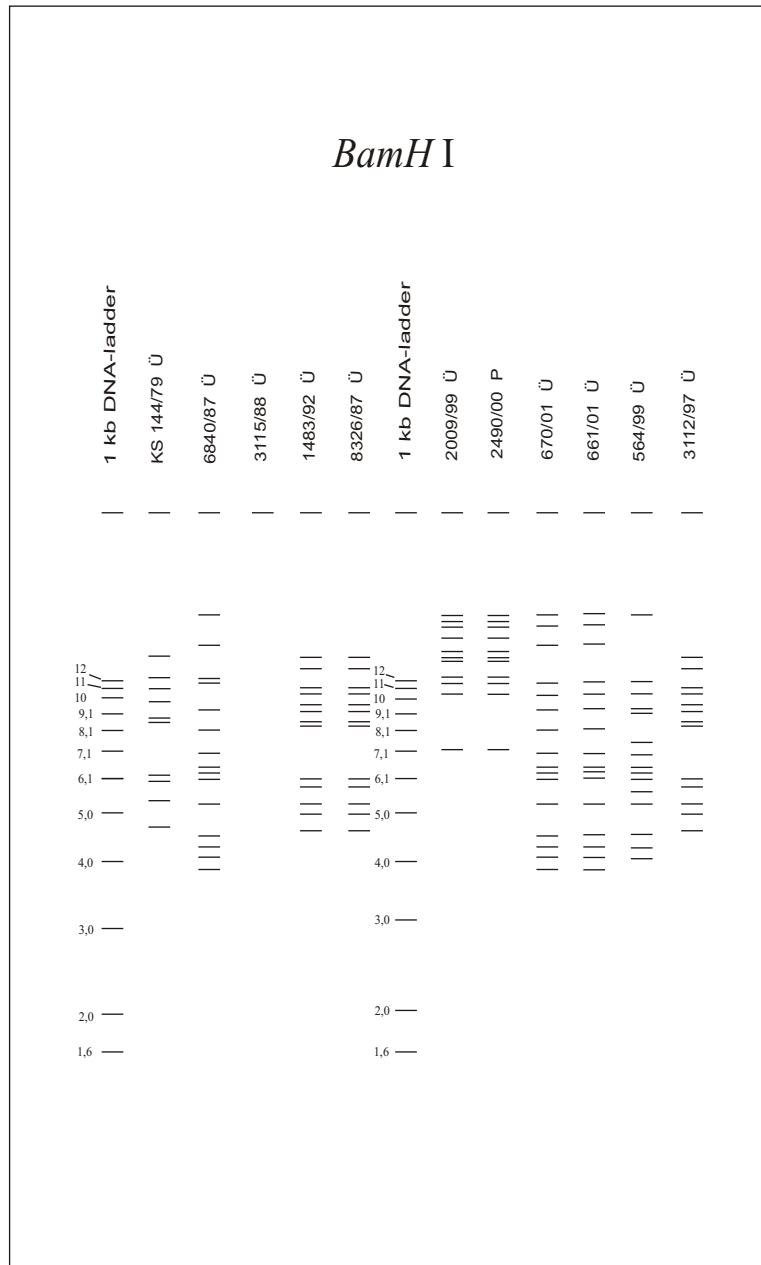


Abbildung 12a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I

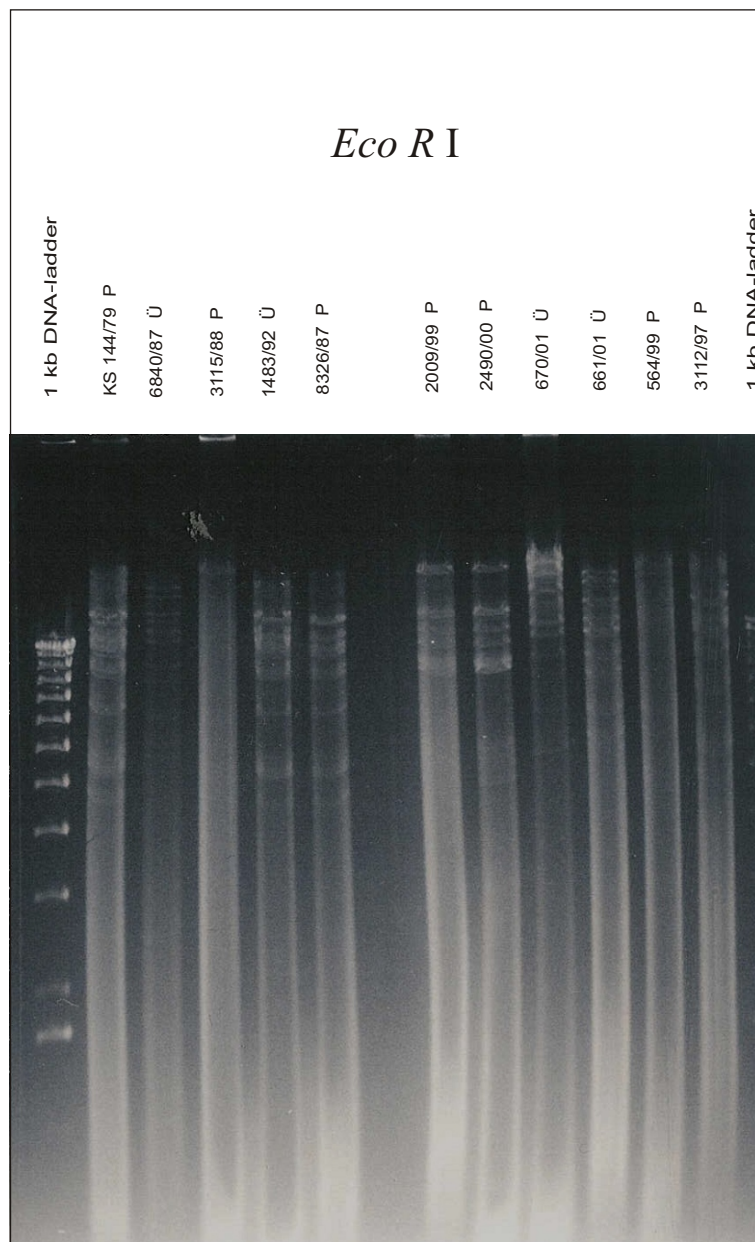


Abbildung 12b: Schematische Darstellung der Restriktionsmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I

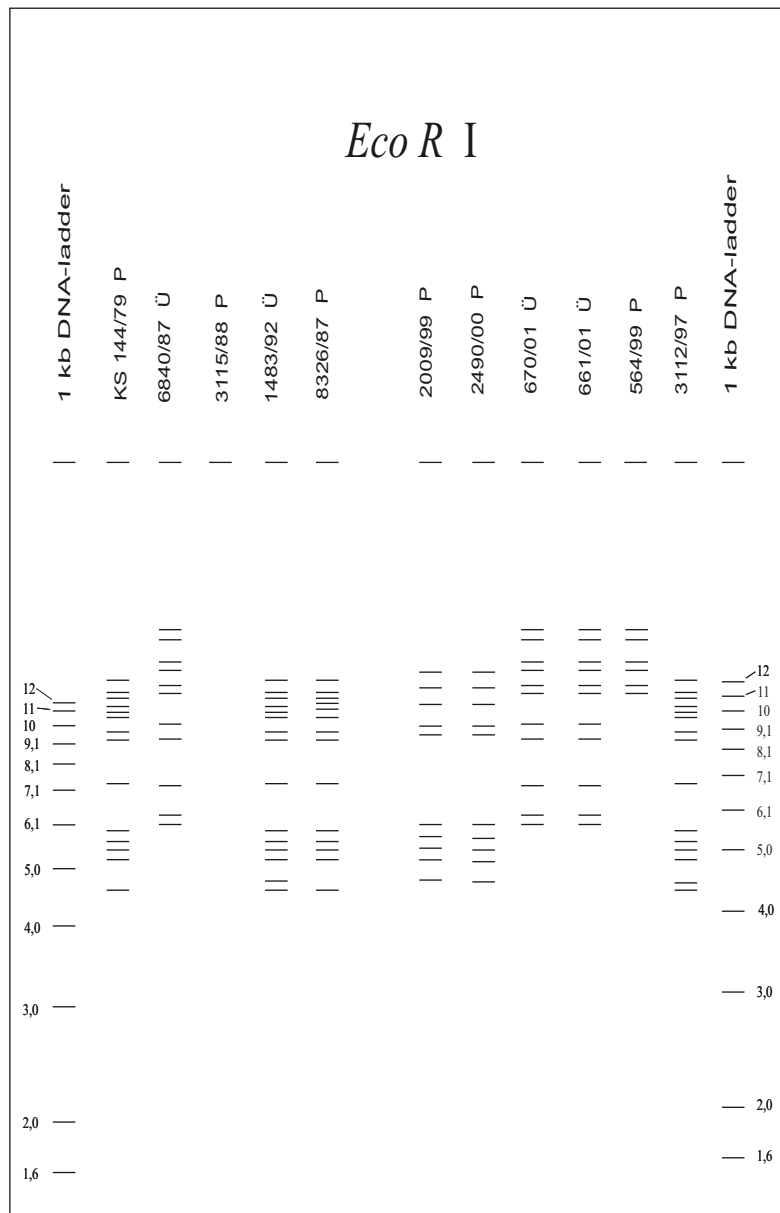


Abbildung 13a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I

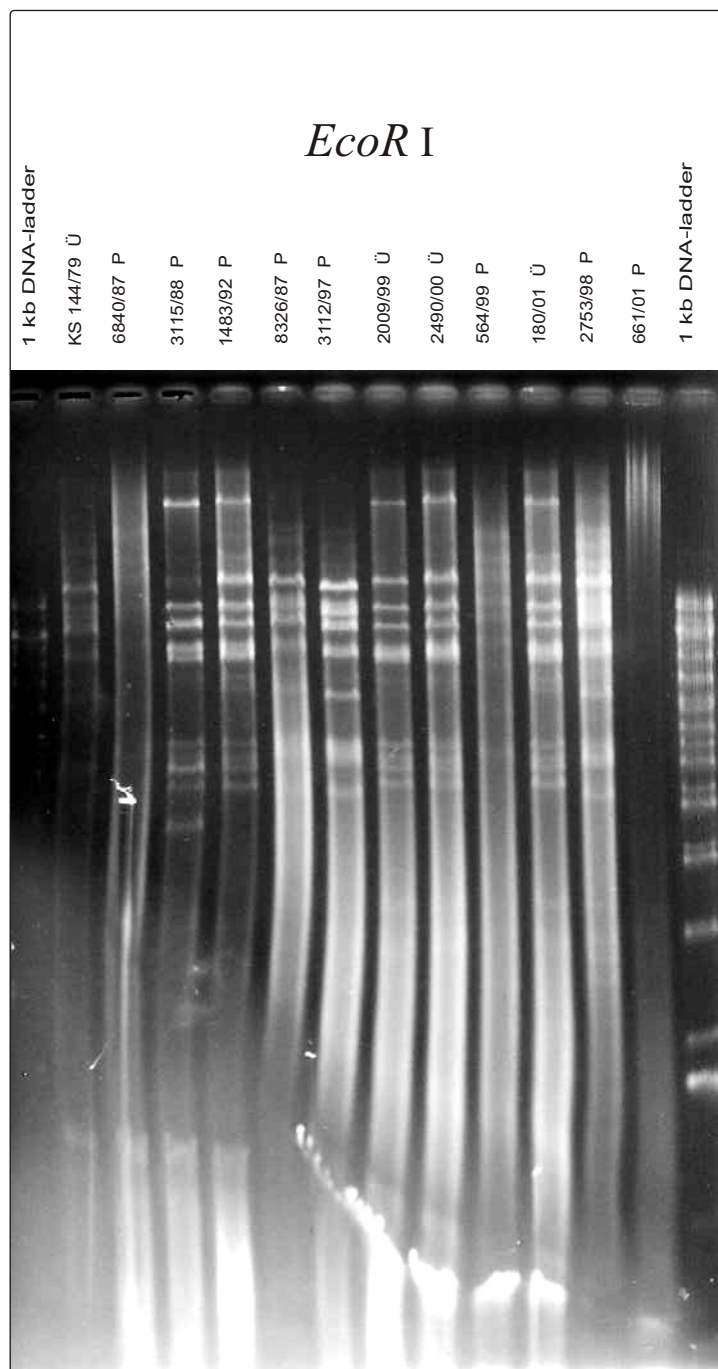


Abbildung 14a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III

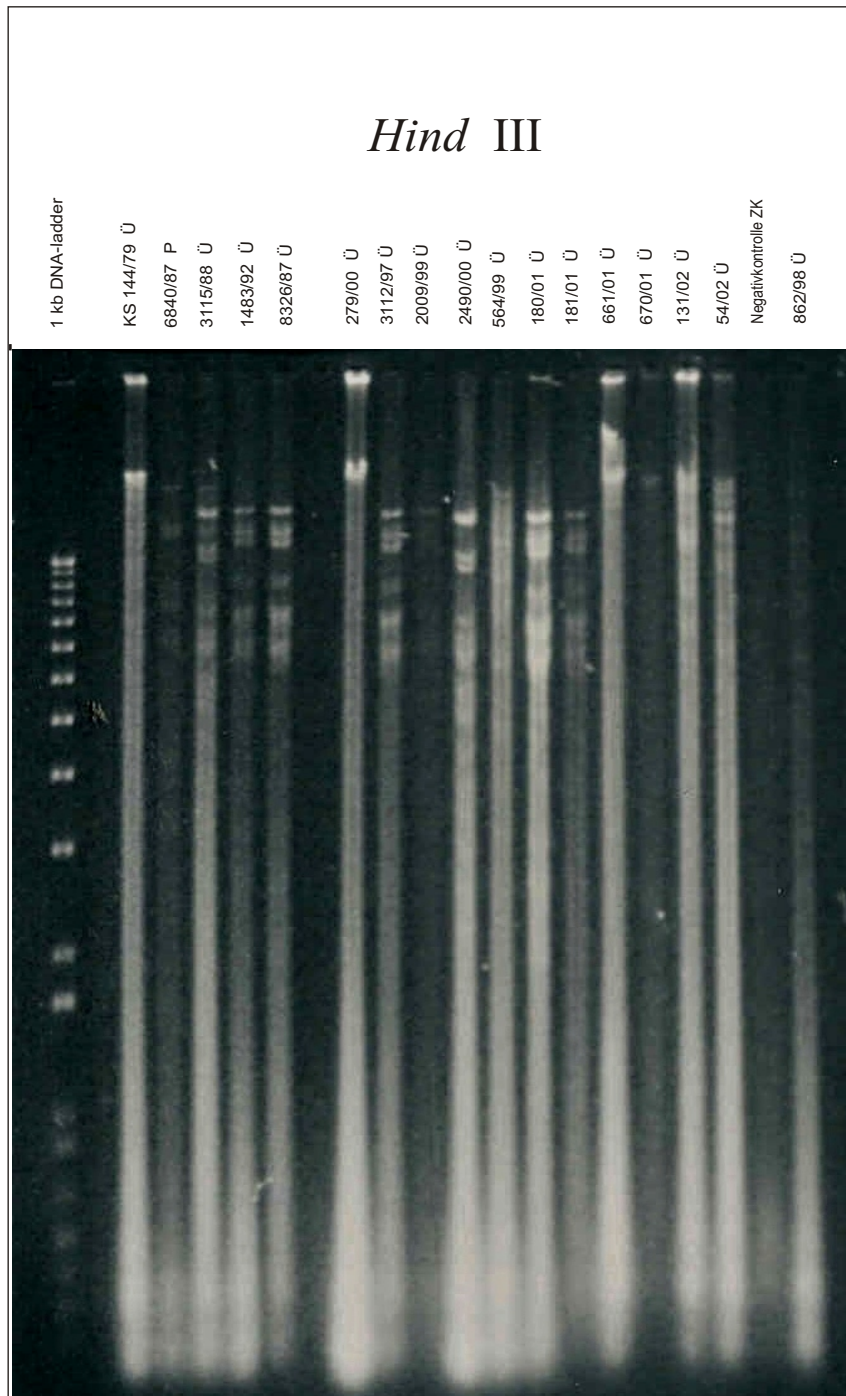


Abbildung 15a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Hpa* II

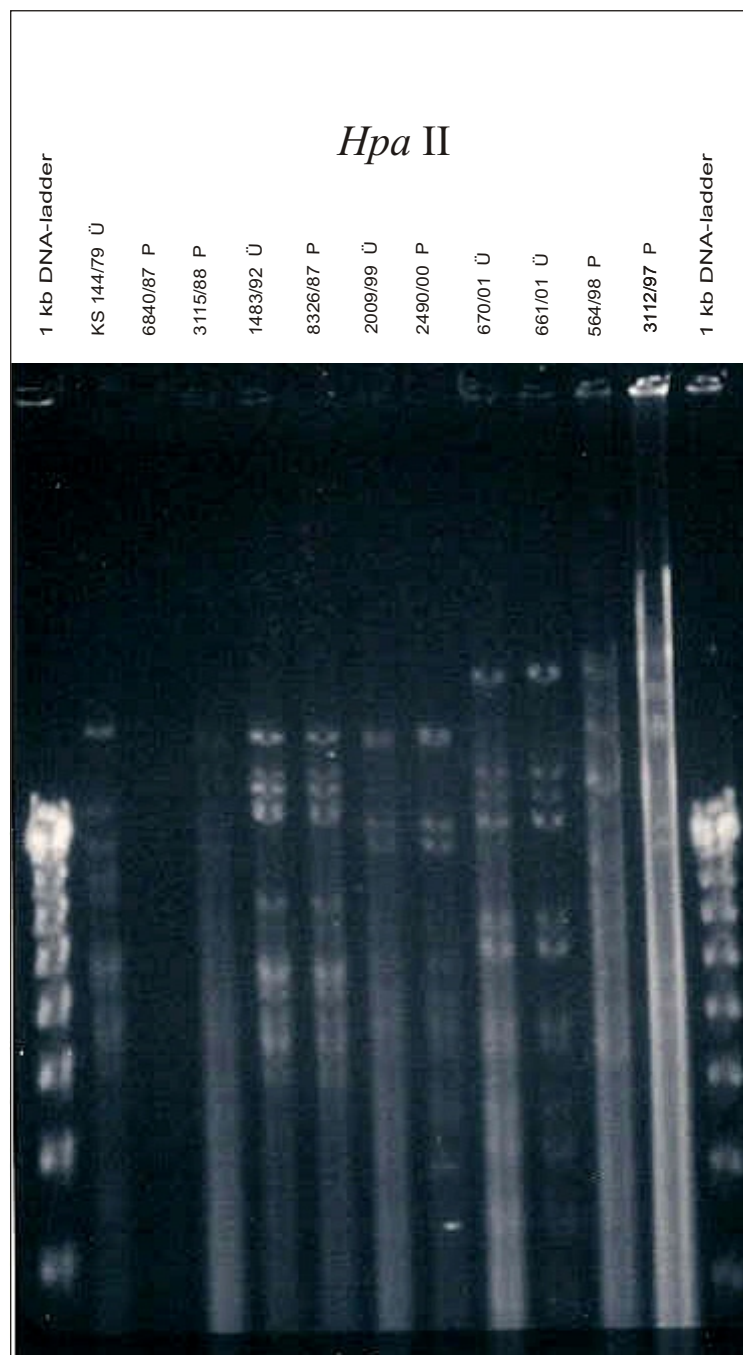


Abbildung 16a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Pst* I

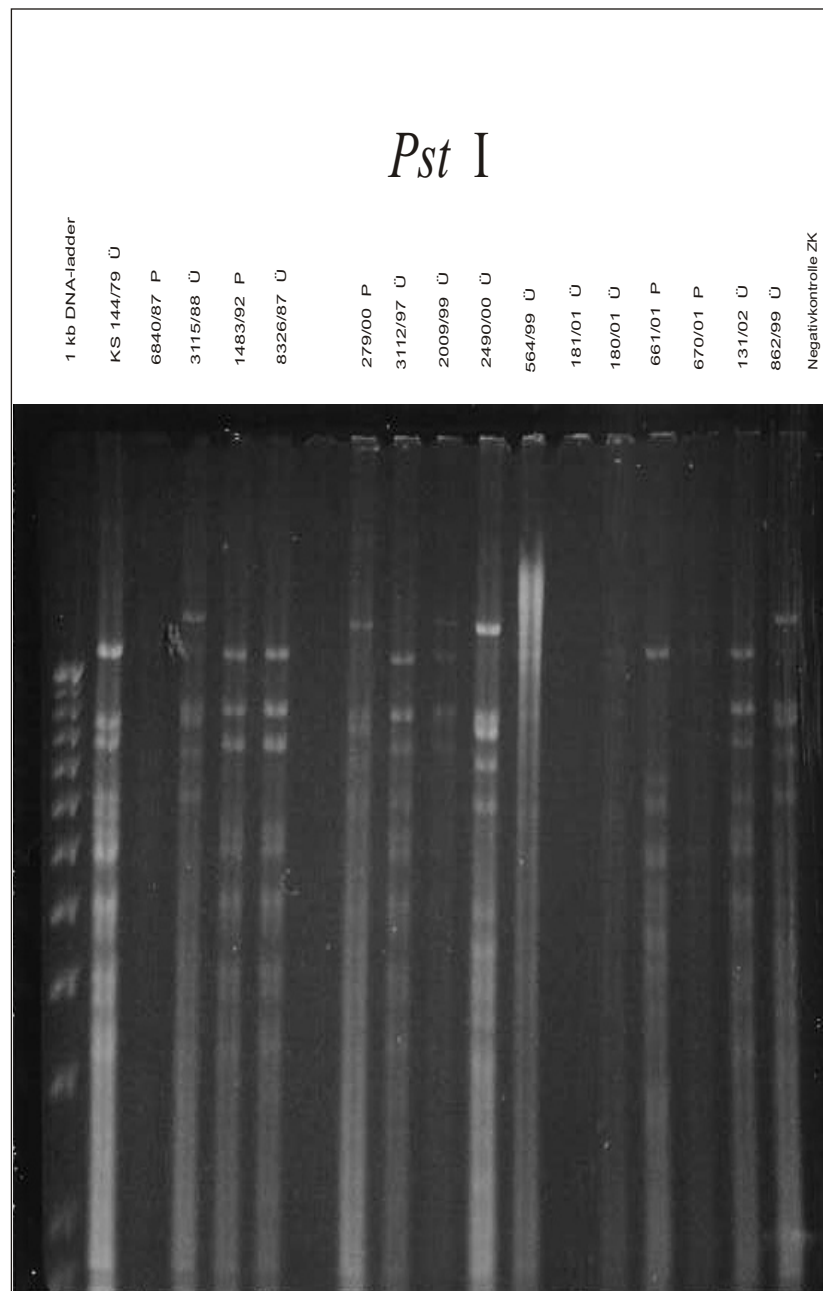
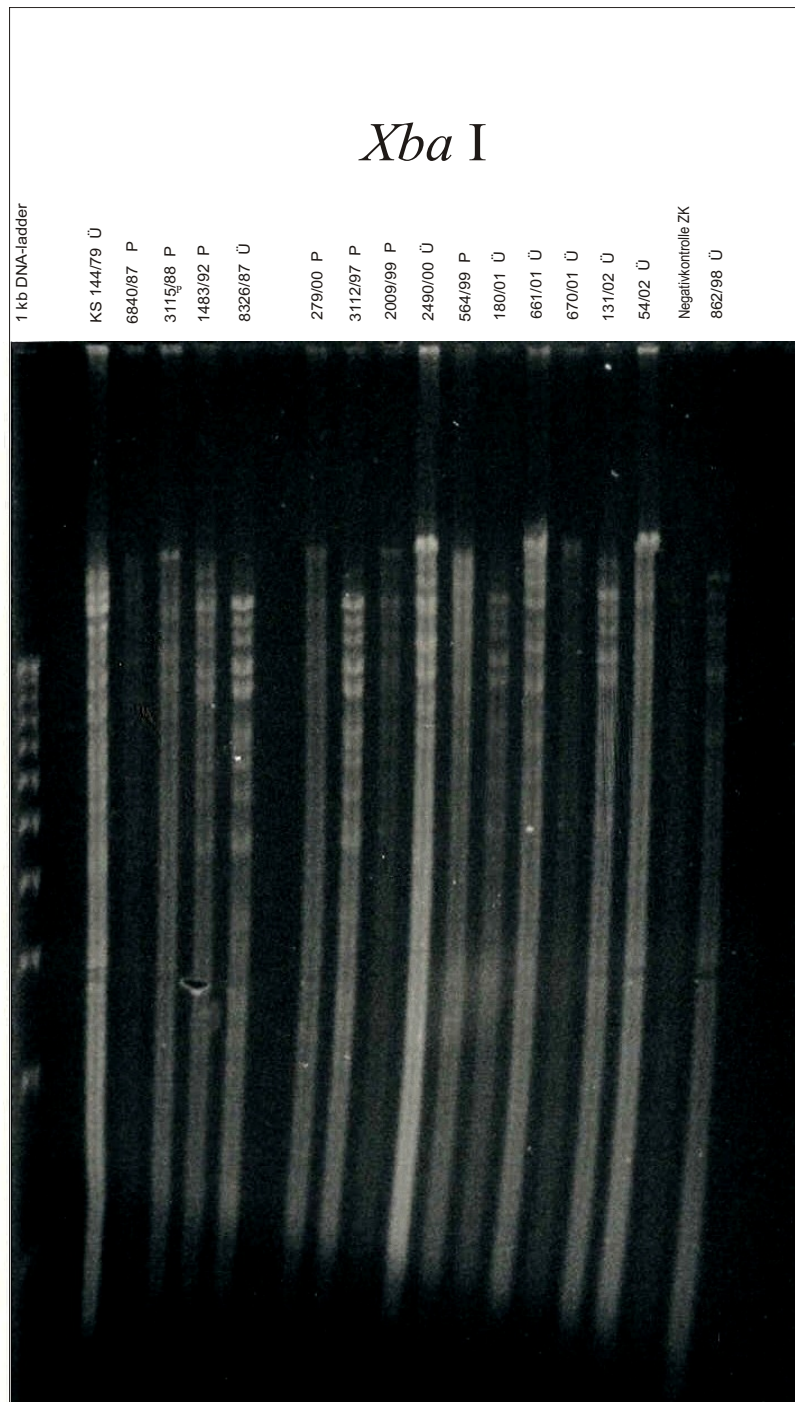


Abbildung 17a: Foto der Fragmentmuster der genannten PsHV-Isolate nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Xba* I



Bei den untersuchten Isolaten zeigen sich mehrere Gruppen ähnlicher oder gleicher Bandenmuster, wobei sich diese Einteilung bei der Spaltung mit den unterschiedlichen Enzymen jeweils mehr oder weniger deutlich bestätigt. Die Fragmentmuster der im Rahmen dieser Arbeit analysierten eigenen Isolate wurden im Hinblick auf eine mögliche Zuordnung zu den in der Dissertationsschrift von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) definierten Restriktionsgruppen untersucht. Daher erfolgte die Auswertung der Spaltmuster in Anlehnung an die Vorgehensweise von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999), wobei alle Isolate, die bei Verwendung einer Restriktionsendonuklease das gleiche Bandenmuster zeigen, in eine übergeordnete Restriktionsgruppe eingeteilt werden. Die Einteilung in Untergruppen wird aufgrund der Untersuchungen mit den übrigen 6 Endonukleasen vorgenommen. Nur diejenigen Isolate, bei denen das gefundene Bandenmuster mit von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) beschriebenen Mustern identisch ist, werden in die entsprechende von der Autorin definierte Untergruppe eingeteilt. Bei Unterschieden werden für die eigenen Isolate in numerischer Reihenfolge neue Untergruppen beziffert.

Alle Isolate, die bei Verwendung der Restriktionsendonuklease *EcoR* I das gleiche Bandenmuster zeigen, werden als Restriktionsgruppe A definiert. Das gleiche Bandenmuster nach Spaltung mit *EcoR* I zeigen die 5 Isolate 131/01, 180/01, 181/01, 3112/97 und 2753/98. Durch Spaltung mit den übrigen 6 Endonukleasen kann innerhalb dieser ersten übergeordneten Gruppe zusätzlich zu den 3 von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) gefundenen Untergruppen eine weitere Untergruppe unterschieden werden. Diese Untergruppe A4 wird von den Isolaten 180/01, 181/01, 131/02 und 3112/97 gebildet, welche alle bei Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Xho* I das gleiche Fragmentmuster zeigen. Das Bandenmuster des Isolates 3112/97 zeigt nach Spaltung mit *Xba* I kleinere Unterschiede im Vergleich zu den anderen Isolaten dieser Untergruppe. Daher kann bei Verwendung dieses Restriktionsenzym eine weitere Unterteilung innerhalb der Untergruppe A4 in A4.1 und A4.2 und somit eine Trennung des Isolates 3112/97 von den Isolaten 180/01, 181/01 und 131/02 vorgenommen werden. Das Isolat 2753/98 zeigt nach Spaltung mit *Xho* I ein mit dem als Referenzvirus für den Serotyp PsHV-4 verwendeten Isolat 1483/92 identisches Fragmentmuster und wird aus diesem Grund der von SCHRÖDER-

GRAVENDYCK (1999) definierten und bislang allein durch 1483/92 repräsentierten Untergruppe A3 zugeordnet. Da bei Isolat 2753/98 jedoch nur auswertbare Bandenmuster nach Spaltung mit den Enzymen *EcoR* I und *Xho* I zur Verfügung stehen, ist keine endgültige Aussage über die genaue Zugehörigkeit dieses Isolates zur Untergruppe A3 möglich.

Der Restriktionsgruppe B werden die Isolate 564/99, 661/01, 670/01 und 54/02 zugeordnet. Analog zu den Befunden von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) zeigte die DNA dieser Isolate bei Verwendung der Enzyme *EcoR* I und *Hind* III die gleichen Spaltmuster. Auch hier ist eine Differenzierung durch Spaltung mit den Enzymen *Xho* I, *Xba* I und *Hpa* II möglich, wobei lediglich die Isolate 661/01 und 670/01 bei jeder Spaltung ein identisches Muster aufweisen. Es können somit zusätzlich zu den von SCHRÖDER-GRAVENDYCK gebildeten Untergruppen B1 und B2 3 weitere Untergruppen (B3 bis B5) mit jeweils 1 bzw. bei den Isolaten 661 und 670/01 2 repräsentanten Isolaten unterschieden werden. Da von dem Isolat 54/02 nur 2 auswertbare Fragmentmuster vorhanden sind, (bei diesem Isolat konnte keine Spaltung mit *EcoR* I durchgeführt werden) ist dessen Zuordnung zur Restriktionsgruppe B nur bedingt möglich.

Isolate, die bei Verwendung von *BamH* I das gleiche Fragmentmuster aufweisen und nicht den Gruppen A und B zugeordnet werden können, bilden nach SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) die Restriktionsgruppe C. Es handelt sich hierbei um die Isolate 2009/99, 2490/00, 279/00 und 862/98. Da Isolat 862/98 bei Verwendung der Restriktionsendonuklease *BamH* I kein auswertbares Bandenmuster hervorbrachte, können nur Spaltungen mit *Pst* I und *Xba* I zur Beurteilung herangezogen und daher auch bei diesem Isolat nur bedingt gültige Aussagen über die Zugehörigkeit getroffen werden. Bei beiden Spaltmustern zeigen sich geringfügige Unterschiede zu den Mustern aller anderen Isolate der Restriktionsgruppe C. Daher wird davon ausgegangen, dass es sich bei Isolat 862/98 um den alleinigen Vertreter der hier neu bezifferten Untergruppe C3 handelt. Die Fragmentmuster der Isolate 2009/99 und 2490/00 sind bei allen Spaltungen untereinander identisch und zeigen bei Restriktion mit den Enzymen *Hind* III, *Pst* I und *Xho* I keine Unterschiede zu dem Fragmentmuster des als Referenz für

PsHV-3 mitgeführten Isolates 3115/88. Daher werden diese beiden Isolate der von SCHRODER-GRAVENDYCK (1999) definierten Untergruppe C1 zugeordnet. Isolat 279/00 zeigt bei Spaltung mit *Pst* I das gleiche Fragmentmuster wie 2009/99 und 2490/00, weist jedoch bei den anderen eingesetzten Enzymen geringfügige Unterschiede auf. Aus diesem Grund wird eine weitergehende Aufspaltung in die beiden Untergruppen C1.1 und C1.3 vorgenommen.

4.4 Polymerasekettenreaktion

4.4.1 Amplifikation der Virusisolate mittels PsHV-PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2000)

Die in den Tabellen 2 und 3 aufgeführten PsHV-Isolate wurden, wie unter Punkt 3.2.4 angegeben, in 3 komplett voneinander getrennten Wiederholansätzen präpariert und die DNA jeweils unter Verwendung der in Tabelle 9 aufgelisteten, von TOMASZEWSKI et al. im Jahre 2001 veröffentlichten Primerpaare mittels PCR amplifiziert. Die Analyseergebnisse der PCR-Produkte im Agarosegel (Abbildungsbeispiele Abb. 20 bis 24) sind in den Tabellen 25 und 26 wiedergegeben, wobei die Ergebnisse entweder als positiv, negativ oder fraglich positiv (nach wiederholten Untersuchungen PCR-Produkt jedesmal nur als sehr dünne, schwach gefärbte Bande erkennbar) bezeichnet wurden.

Die Auswertung der erhaltenen PCR-Ergebnisse sowie die Einteilung der Isolate in verschiedene PsHV-Varianten erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von TOMASZEWSKI et al. (2001). Eine Variante wird dabei definiert durch die Fähigkeit der 5 Primerpaare, im Genom der untersuchten PsHV-Isolate einen zu ihrer Sequenz komplementären DNA-Abschnitt zu detektieren. Eine fehlende DNA-Amplifizierung führt zu der Schlußfolgerung, daß die Sequenz der Primerpaare sich so stark von der zu untersuchenden Ziel-DNA unterscheidet, daß ein „Annealing“ nicht möglich ist. Die somit nach Durchführung der PCR mit allen 5 Primerpaaren entstehenden unterschiedlichen Amplifizierungsmuster werden als PsHV-Varianten bezeichnet. Insgesamt wurden 9 verschiedene Varianten beobachtet (vgl. Tabelle 27), wobei nicht alle Varianten bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolaten in gleicher Häufigkeit vorkommen (siehe Tabelle 27). Der überwiegende Teil aller Isolate zeigt die Amplifizierungsmuster der Varianten 1 bis 4 bzw. 5, wobei deren Numerierung analog zu den bei der vergleichenden Untersuchung der „Referenzviren“ für die 5 serologischen Subtypen (nach GRAVENDYCK et al., 1996) gefundenen Amplifizierungsmustern erfolgte. Variante 5 wird durch das als Referenzvirus für den serologischen Subtyp 5 eingesetzte Isolat 8326/87 repräsentiert und ist zusammen mit Variante 4 in einer Zeile aufgeführt, da sich das Amplifizierungsmuster nicht von dem

der Variante 4 unterscheidet. Die Amplifizierungsmuster der Varianten 6 bis 9 wurden jeweils bei nur einem Isolat gefunden (Tabelle 27).

Von den insgesamt 42 Isolaten (siehe unter Punkt 3.1.1.1 und 3.1.1.2), die mit den 5 verschiedenen Primerpaaren untersucht wurden, konnte bei allen (100%) mit einem oder mehreren Primern ein PCR-Produkt produziert und dementsprechend virale DNA amplifiziert werden. Die Untersuchung der DNA der als Kontrolle parallel mitgeführten uninfizierten HEF-Kultur ergab bei keinem dieser Primer ein PCR-Produkt. Unter Verwendung des Primerpaares 9F waren unter den aufgeführten Bedingungen bei allen untersuchten Isolaten Amplifikate in den erwarteten Längenbereichen vorhanden.

Die Abbildungen 20 bis 24 zeigen Fotos PsHV-PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2001). Es wird für jedes der 5 zur Differenzierung der jeweils genannten Isolate eingesetzten Primerpaare beispielhaft ein Agarosegel dargestellt.

Die Tabellen 29 und 30 zeigen einen vergleichenden Überblick über die mittels serologischer Kreuzneutralisationstests, Spaltungen durch Restriktionsenzyme sowie PCR gewonnenen Ergebnisse, d.h. die Einteilung in Serogruppe, Restriktionsgruppe und PCR-Variante.

Tabelle 25: Ergebnisse der PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2001) nach Amplifikation der DNA der 5 Referenzviren sowie der 14 neuen PsHV-Isolate mit verschiedenen Primerpaaren

PsHV-Isolat Nr.	Primerbezeichnung				
	9F	9R	11F	11R	23F
KS144/79	+	+	+	+	+
6840/87	+	-	-	-	-
3115/90	+	-	+	+	+
1483/92	+	+	+	-	+
8326/87	+	+	+	-	+
3112/97	+	+	+	-	+
2753/98	+	+	+	-	+
862/98	+	-	+	+	+
564/99	+	-	-	-	-
2009/99	+	-	+	+	+
2490/00	+	-	+	(+)	+
279/00	+	-	+	+	+
180/01	+	+	+	-	+
181/01	+	+	+	-	+
661/01	+	-	-	-	-
663/01	+	-	-	-	-
670/01	+	-	-	-	-
54/01	+	-	-	-	-
131/01	+	+	+	+	+
Anzahl positiver Reaktionen je Primerpaar	19	7	12	6(7)	12

Legende zur Tabelle 25:

- = keine Amplifizierung des erwarteten Fragmentes

+ = Amplifizierung des erwarteten Fragmentes

(+) = schwache Amplifizierung

Tabelle 26: Ergebnisse der PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2001) nach Amplifikation der DNA der 31 sonstigen PsHV-Isolate mit verschiedenen Primerpaaren sowie prozentuale Häufigkeit der Amplifizierung des erwarteten Fragmentes je Primerpaar

PsHV-Isolat Nr.	Primerpaar				
	9F	9R	11F	11R	23F
6090/82	+	+	+	-	+
1639/87	+	-	+	-	+
1674/87	+	+	+	-	+
6733/87	+	-	-	-	-
6896/87	+	-	-	-	-
6908/87	+	-	-	-	-
5376/88	+	-	(+)	+	+
6058/89	+	+	+	+	+
7077/89	+	+	+	+	+
7129/89	+	+	+	-	+
1979/90	+	+	+	-	+
2864/90	+	-	+	+	+
3042/90	+	+	+	-	+
5174/90	+	+	+	-	+
5092/91	+	+	+	+	+
1613/92	+	+	+	+	-
2609/92	+	+	+	-	+
2384/92	+	-	-	+	+
1587/92	+	+	+	-	+
1071/93	+	-	-	+	-
1606/94	+	-	-	-	-
2335/94	+	-	+	+	+
4739/94	+	-	+	+	+
5139/94	+	-	+	+	+

PsHV-Isolat Nr.	Primerpaar				
	9F	9R	11F	11R	23F
5192/94	+	-	+	+	+
1257/95	+	+	+	+	+
1277/95	+	-	-	-	-
1987/95	+	+	+	-	+
2162/95	+	+	+	-	+
2685/95	+	+	+	-	+
4133/95	+	-	-	-	-
Anzahl positiver Reaktionen je Primerpaar	31	16	22 (23)	13	23

Legende zur Tabelle 26:

- = keine Amplifizierung des erwarteten Fragmentes

+ = Amplifizierung des erwarteten Fragmentes

(+) = schwache Amplifizierung

Tabelle 27: Bei der PCR-Untersuchung der PsHV-Isolate gefundene Amplifizierungsmuster Zuordnung zu PCR-Varianten

Variante Nr.	Amplifizierungsmuster				
	9F	9R	11F	11R	23F
1	+	+	+	+	+
2	+	-	-	-	-
3	+	-	+	+	+
4 bzw. 5	+	+	+	-	+
6	+	-	+	-	+
7	+	-	-	+	+
8	+	+	+	+	-
9	+	-	-	+	-

Legende zur Tabelle 27:

- = keine Amplifizierung des erwarteten Fragmentes mit dem genannten Primer
- + = Amplifizierung des erwarteten Fragmentes mit dem genannten Primer

Tabelle 28: Anzahl der Isolate je Variante und relative Häufigkeit der Varianten in Prozent

Variante Nr.	Neue Isolate je Variante	Prozent	Sonstige Isolate je Variante	Prozent	Isolate gesamt je Variante	Prozent
1	1	7	3	10	4	9
2	5	36	6	20	11	25
3	3	21	5	16	8	18
4 bzw. 5 ¹	4	29	12	39	16	37
6	0	0	1	3	1	2
7	0	0	1	3	1	2
8	0	0	1	3	1	2
9	0	0	1	3	1	2
k.Z. ²	1	7	1	3	2	4
Gesamt	14	100	31	100	45	100

Legende zur Tabelle 28:

¹Variante Nr. 5 stellt keine eigene Variante dar, da das Amplifizierungsmuster identisch mit dem der Variante 4 ist (vgl. Tabelle 25). Sie wurde lediglich bei dem als Referenzvirus für den serologischen Subtyp PsHV-5 (nach GRAVENDYCK et al., 1996) verwendeten Isolat 8326/87 (siehe Tabelle 23) gefunden und daher aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit getrennt numeriert.

²k.Z.= keine Zuordnung möglich

Abb.19: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung aller in der PCR untersuchten 45 Isolate auf die 9 Varianten (vgl. Tabelle 26 und 27)

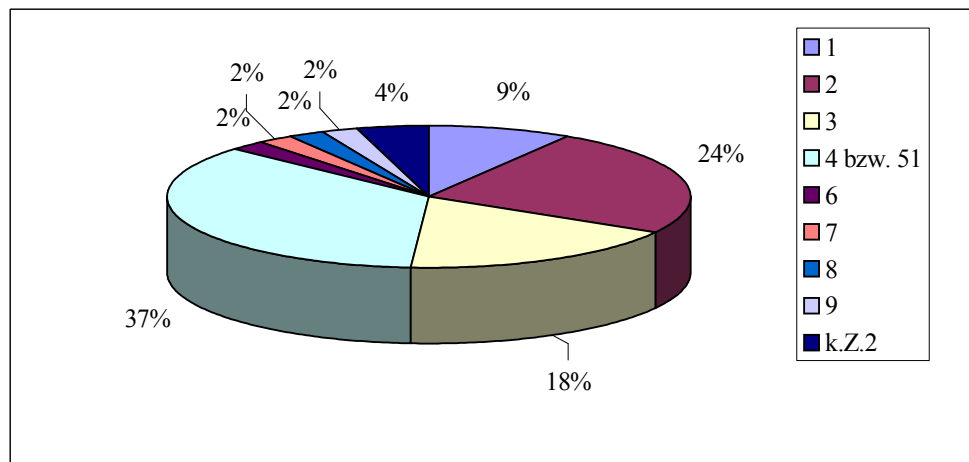


Abb. 20: PsHV-PCR nach Tomaszewski et al (2001): PCR-Produkte der genannten Isolate nach Amplifikation mit dem Primer **9F**

(L=DNA-Längenstandard λ -DNA *Hind* III und Φ X174-DNA *Hae* III (50 ng/ μ l);

Spuren 1-12= Analyisierte PsHV-Isolate: 1=KS144/79, 2=6840/87; 3= 3115/90; 4=1483/92; 5=8326/87; 6=2009/99; 7=3112/97; 8=670/01; 9=661/01; 10=564/99; 11=862/98; 12=180/01; ZK=uninfizierte Zellkultur als Negativkontrolle, Aufreinigung erfolgte parallel zu den PsHV-Isolaten; H₂O=Kontaminationskontrolle DEPC-H₂O)

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 ZK H₂O

489 Bp ►

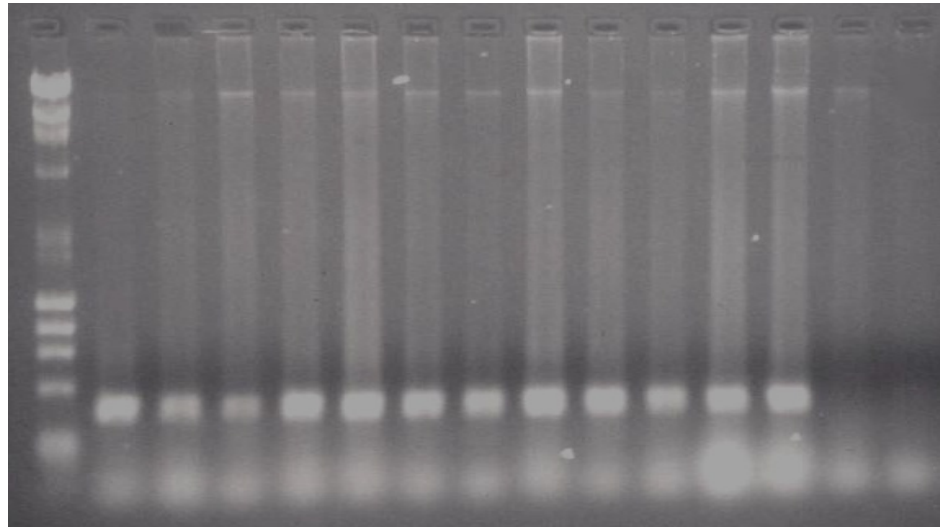


Abb. 21: PsHV-PCR nach Tomaszewski et al (2001): PCR-Produkte der genannten Isolate nach Amplifikation mit dem Primer **9R**

(L=DNA-Längenstandard λ -DNA *Hind* III und Φ X174-DNA *Hae* III (50 ng/ μ l);
Spuren 1-13= Analyisierte PsHV-Isolate: 1=KS144/79, 2=6840/87; 3= 279/00; 4=3115/90;
5=1483/90; 6=8326/87; 7=2009/99; 8=3112/97; 9=564/99; 10=862/98; 11=670/01;
12=661/01; 13=180/01; ZK=uninfizierte Zellkultur als Negativkontrolle, Aufreinigung
erfolgte parallel zu den PsHV-Isolaten; H₂O=Kontaminationskontrolle DEPC-H₂O)

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 ZK H₂O

378 Bp ►

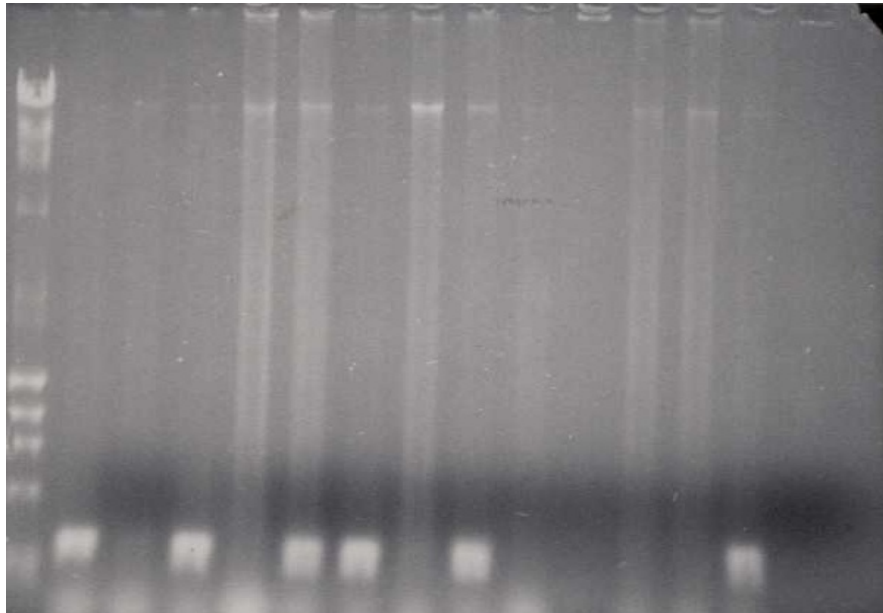


Abb. 22: PsHV-PCR nach Tomaszewski et al (2001): PCR-Produkte der genannten Isolate nach Amplifikation mit dem Primer **11F**

(Legende zu L; Spuren 1-13; ZK und H₂O siehe Abb. 21)

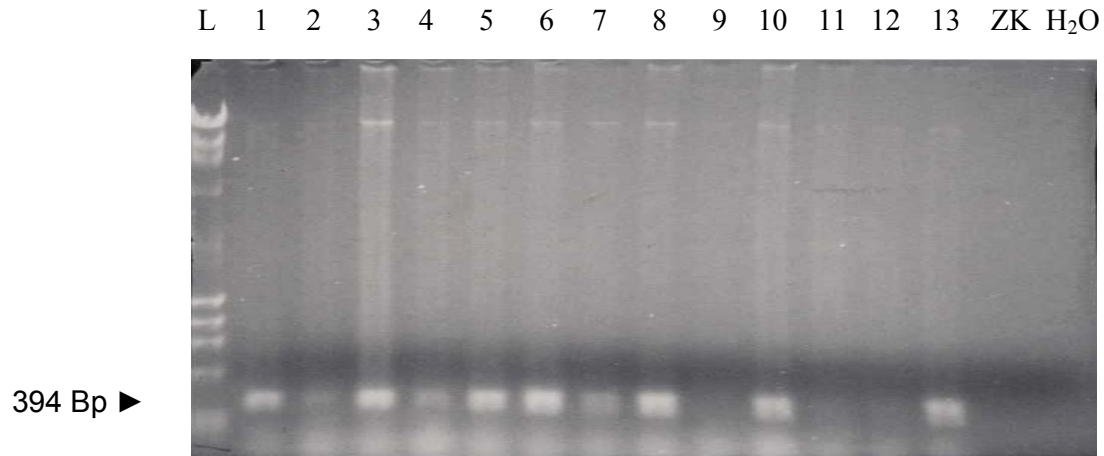


Abb. 23: PsHV-PCR nach Tomaszewski et al (2001): PCR-Produkte der genannten Isolate nach Amplifikation mit dem Primer **11R**

(Legende zu L; Spuren 1-13; ZK und H₂O siehe Abb. 21)

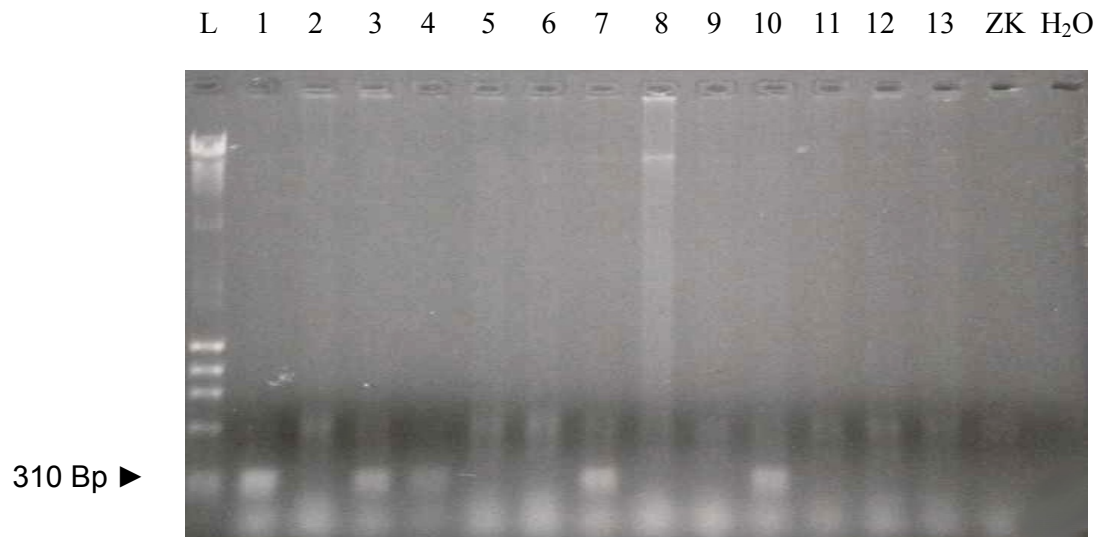


Abb. 24: PsHV-PCR nach Tomaszewski et al (2001): PCR-Produkte der genannten Isolate nach Amplifikation mit dem Primer **23F**

((L=DNA-Längenstandard λ -DNA *Hind* III und Φ X174-DNA *Hae* III (50 ng/ μ l);
Spuren 1-12= Analyisierte PsHV-Isolate: 1=KS144/79, 2=6840/87; 3= 279/00; 4=3115/90;
5=1483/90; 6=8326/87; 7=3112/97; 8=670/01; 9=661/01; 10=564/99; 11=862/98;
12=180/01; ZK=uninfizierte Zellkultur als Negativkontrolle, Aufreinigung erfolgte parallel
zu den PsHV-Isolaten; H₂O=Kontaminationskontrolle DEPC-H₂O)

L 1 2 3 4 5 6 7 8 10 11 12 13 ZK H₂O

281 Bp ►

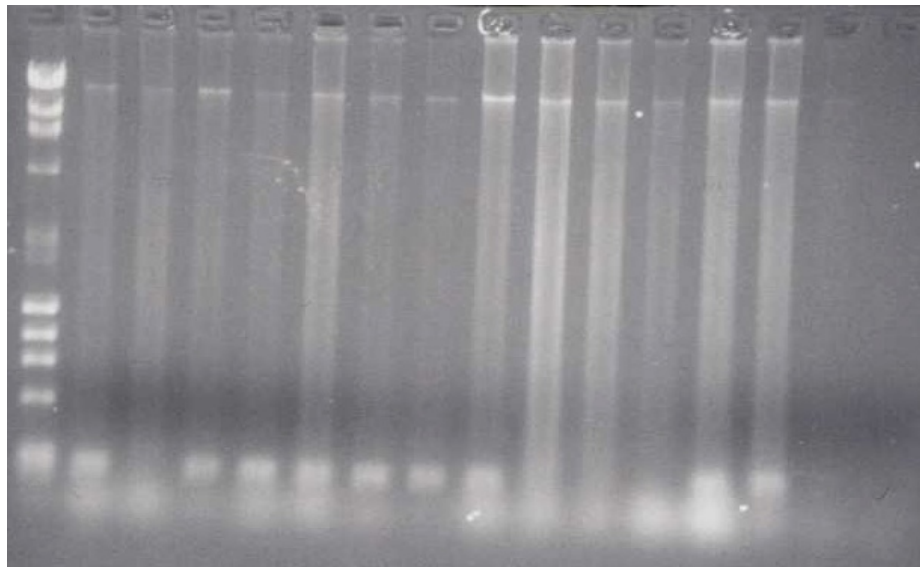


Tabelle 29: Vergleichender Überblick über die Einteilung der 14 neuen¹ PsHV-Isolate im Hinblick auf die Ergebnisse der serologischen Untersuchung, der Restriktionsenzymanalyse sowie der Untersuchung mittels Polymerasekettenreaktion

PsHV-Isolat Nr.	Sero-log. Einteilung	PCR-Variante	Restriktionsgruppe							
			<i>EcoR</i> I	<i>BamH</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I	
KS 144/79 ¹	1	1	A	A1	A1	-	A1	A1	A1	
131/01			-	-	-	-	A4	A4.1	A4	
180/01; 181/01	4 o. 5	4 o. 5	A	-	-	A4	-			A4.2
3112/97				A4	-	-	A4			
1483/92 ¹ ; 8326/87 ¹				A3	A3	A3	A3	A3	A3	A3
2753/98				-	-	-	-	-	-	
6840/87 ¹	2	2	B	B1	-	B	B1	-	-	
564/99				B3	B3		-	-	-	
661/01; 670/01				B4	B4		B4	B4	B4	
54/01				-	-		-	-	-	B5
3115/88 ¹ ; 2009/99; 2490/00	3	3	C	C	C1.1	C1.1	C1	C1.1	C1.1	
279/00					-	C1.3		-	C1.3	
862/98					-	-	-	-	C3	C3

Legende zur Tabelle 29:

¹: Die Ergebnisse der 5 als Referenzviren verwendeten und im Rahmen dieser Arbeit bei allen Methoden mit untersuchten PsHV-Isolate KS 144/79, 6840/87, 3115/88, 1483/92 und 8326/87 sind aufgrund der besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnisse und der Einteilung von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) in dieser Tabelle mit aufgeführt

Tabelle 30: Gegenüberstellung der Einteilung der 30 sonstigen PsHV-Isolate nach den Ergebnissen der serologischen Untersuchung und der Analyse mittels Polymerasekettenreaktion

PsHV-Isolat Nr.	Serologische Einteilung (PsHV)	PCR-Variante
6090/82	4 o. 5	4 o. 5
1639/87	3	6
1674/87	1	4 o. 5
6733/87	2	2
6896/87	2	2
6908/87	2	2
5376/88	1	3 o. 7
6058/89	1	1
7077/89	1	1
7129/89	1	4 o. 5
1979/90	1	4 o. 5
2864/90	3	3
3042/90	4 o. 5	4 o. 5
5174/90	4 o. 5	4 o. 5
5092/91	1	1
1613/92	1	8
2609/92	4 o. 5	4 o. 5
2384/92	3	7
1587/92	4 o. 5	4 o. 5
1071/93	2	9
1606/94	2	2
2335/94	3	3
4739/94	3	3
5139/94	3	3

PsHV-Isolat Nr.	Serologische Einteilung (PsHV)	PCR-Variante
5192/94	3	3
1257/95	1	1
1277/95	2	2
1987/95	4 o. 5	4 o. 5
2162/95	4 o. 5	4 o. 5
2685/95	4 o. 5	4 o. 5
4133/95	2	2

Tabelle 31: Einteilung aller untersuchten PsHV-Isolate nach Spezies, serologischer Gruppierung, Restriktionsgruppe und PCR-Variante

PsHV-Isolat Nr.	Spezies	Serosubtyp (PsHV)	Restriktions- gruppe¹	PCR- Variante
3112/97	k. A.	4 o. 5	A4.2	4 o. 5
2753/98	Taubenhalsamazone	4 o. 5	A3	4 o. 5
862/98	Soldatenara	3	C3	3
564/99	Gelbstirnamazone	2	B3	2
2009/99	Blaustirnamazone	3	C1.1	3
2490/00	Cubaamazone	3	C1.1	3
279/00	Blaustirnamazone	3	C1.3	3
180/01	Mönchssittich	4 o. 5	A4.1	4 o. 5
181/01	Nymphensittich	4 o. 5	A4.1	4 o. 5
661/01	Blaustirnamazone	2	B4	2
663/01	Rosellasittich	2	B4	2
670/01	Graupapagei	2	B4	2
54/01	Orangenhaubenkakadu	2	B5	2
131/01	Gelbschulteramazone	1	A4	1

PsHV- Isolat Nr.	Spezies	Serosubtyp (PsHV)	Restriktions- gruppe¹	PCR- Variante
6090/82	Rosakakadu	4 o. 5	n. u.	4 o. 5
1639/87	Graupapagei	3	n. u.	6
1674/87	Glatzkopfpapagei	1	n. u.	4 o. 5
6733/87	Blaustirnamazone	2	n. u.	2
6896/87	Graupapagei	2	n. u.	2
6908/87	Timneh-Graupapagei	2	n. u.	2
5376/88	Blaustirnamazone	1	n. u.	3 o. 7
6058/89	Graupapagei	1	n. u.	1
7077/89	Panamaamazone	1	n. u.	1
7129/89	Graupapagei	1	n. u.	4 o. 5
1979/90	Blaustirnamazone	1	n. u.	4 o. 5
2864/90	Gelbwangenamazone	3	n. u.	3
3042/90	Blaustirnamazone	4 o. 5	n. u.	4 o. 5
5174/90	Blaustirnamazone	4 o. 5	n. u.	4 o. 5
5092/91	Gelbbugamazone	1	n. u.	1
1613/92	Venezuelaamazone	1	n. u.	8
2609/92	Taubenhalsamazone	4 o. 5	n. u.	4 o. 5
2384/92	Blaustirnamazone	3	n. u.	7
1587/92	Gelbnackenamazone	4 o. 5	n. u.	4 o. 5
1071/93	Gelbscheitelamazone	2	n. u.	9
1606/94	Molukkenkakadu	2	n. u.	2
2335/94	Blaustirnamazone	3	n. u.	3
4739/94	Rosakakadu	3	n. u.	3
5139/94	Gelbscheitelamazone	3	n. u.	3
5192/94	Blaustirnamazone	3	n. u.	3
1257/95	Scharlachkopfpapagei	1	n. u.	1
1277/95	Orangehaubenkakadu	2	n. u.	2
1987/95	Kubaamazone	4 o. 5	n. u.	4 o. 5

PsHV-Isolat Nr.	Spezies	Serosubtyp (PsHV)	Restriktionsgruppe¹	PCR-Variante
2162/95	Gelbscheitelamazone	4 o. 5	A2 ¹	4 o. 5
2685/95	Felsensittich	4 o. 5	A2 ¹	4 o. 5
4133/95	Amazone	2	F ¹	2

Legende zur Tabelle 31:

k. A.: keine Angaben

n. u.: nicht untersucht

¹: Die PsHV-Isolate 2162/95, 2685/95 und 4133/95 wurden im Rahmen der Dissertationsschrift von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) mittels Spaltung durch Restriktionsendonukleasen untersucht und in die angegebenen Restriktionsgruppen eingeteilt

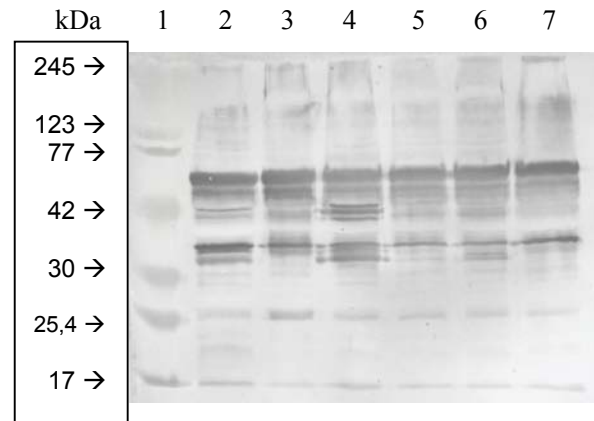
4.5.2 Western Blot

In Vorversuchen wurden als Erstantikörper zum Nachweis von virusspezifischem Antigen polyklonale Hyperimmunseren aus Kaninchen gegen PsHV (vgl. Tabelle 7) in Verdünnungen von 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 und 1:1000 in TBS eingesetzt. Ein Kaninchen-Negativserum wurde ebenfalls in den genannten Verdünnungen getestet. Bis zu der Verdünnung von 1:50 zeigte das negative Kontrollserum unspezifische Bindung an alle auf die Membran geblotteten Proteine. Ab einer Serumverdünnung von 1:100 waren keine unspezifischen Reaktionen des Kaninchen-Negativserums mehr nachweisbar, so dass bei diesem Ansatz nur die Banden des Markers in Spur 1 sichtbar waren. Die positiven Kaninchen-Antiseren zeigten in allen Verdünnungen Bindung an die Proteine sowohl der PsHV-Referenzstämme als auch der nicht infizierten HEF-Kultur. Um spezifische Bindungen an Antigenen zu gewährleisten, wurden die Seren in den weiteren Untersuchungen in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (vgl. Punkt 3.2.5.4). Da sich die Proteinbanden der aus dem Zellkulturüberstand extrahierten Antigene deutlich besser auftrennten und darstellten als diejenigen aus dem Zellpellett, wurden für die folgenden Versuche jeweils nur die aus dem Zellkulturüberstand gewonnenen Extrakte (vgl. Punkt 3.2.5.1) verwendet.

Auf 6 Nitrozellulosemembranen wurden die extrahierten Antigene der 5 PsHV-Referenzstämme und der als Negativkontrolle verwendeten uninfizierten HEF-Kultur geblottet. Anschließend wurden die Membranen zum Nachweis bzw. Vergleich der virusspezifischen Proteine mit jeweils einem der 5 Kaninchen-Antiseren gegen PsHV sowie dem Kaninchen-Negativserum inkubiert.

Bei der Beurteilung stellte sich heraus, dass sich die Kaninchen-Hyperimmunseren nur bedingt zum Nachweis virusspezifischer Proteine eigneten, da sie Reaktivität sowohl mit den unterschiedlichsten Proteinen der PsHV-Stämme als auch der Negativkontrolle zeigten, so dass aufgrund der Vielzahl an detektierten Banden weder eine eindeutige Zuordnung zu virusspezifischen Proteinen noch eine Differenzierung stammspezifischer Antigene möglich war. Abbildung 26 zeigt als Beispiel ein Foto des Western Blots mit dem Kaninchen-Antiserum gegen PsHV 3115/92 als Primärantikörper.

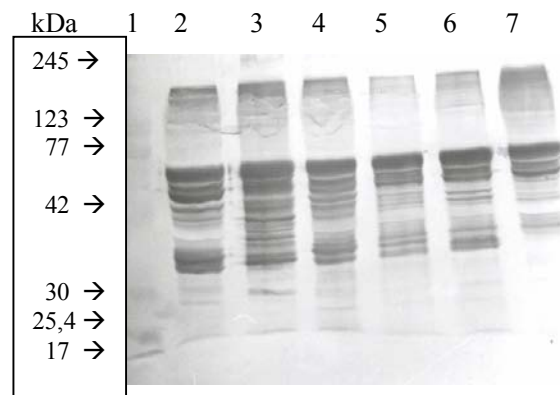
Abb. 26: Western Blot der Virusproteine der PsHV-Referenzstämme (Spur 2-6, vgl. Text zur Abb. 25) und der Negativkontrolle (Spur 7) mit dem Kaninchen-Antiserum gegen PsHV 3115/92. In Spur 1 befindet sich ein Molekulargewichtsmarker (Molekulargewichte in kDa siehe Text zur Abb. 25).



Die zur Immunisierung der Kaninchen bei der Produktion der Antiseren verwendeten Antigene wurden wie unter Punkt 3.2.2.1 beschrieben nach einem von LANCZ (1973) beschriebenen Verfahren gereinigt und angereichert, wobei als Ausgangsmaterial die Überstände aus infizierten bzw. uninfizierten HEF-Kulturen dienen. Da alle 5 Kaninchen-Antiseren die von der Negativkontrolle auf die Nitrozellulosemembran geblohteten Proteinbanden detektierten, ist anzunehmen, daß in den polyklonalen Antiseren Antikörper gegen HEF enthalten sind, welche von den Kaninchen nach deren Immunisierung mit der gereinigten und konzentrierten, adjuvantierten Antigensuspension gebildet wurden. Aus diesem Grund wurde der komplette Versuch wiederholt und die Antiseren zuvor zum Zwecke der Ausfällung bzw. Neutralisierung der gegen die HEF gerichteten Antikörper im Verhältnis 1:1 mit einer mittels Ultraschall behandelten HEF-Suspension versetzt und für 2 Stunden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde anschließend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und der Überstand am nächsten Tag nach Abzentrifugieren der zellulären Bestandteile erneut im Western Blot eingesetzt. Auch nach Inkubation der Antiseren mit der homogenisierten Zellsuspension wurde im Western Blot keine Verbesserung in Form einer Reduktion der Anzahl an detektierten Proteinbanden erzielt

und somit konnte wiederum weder eine eindeutige Zuordnung virusspezifischer Proteine noch eine Differenzierung derselben zwischen den 5 verschiedenen PsHV-Referenzstämmen vorgenommen werden (Abb. 27).

Abbildung 27: Western Blot der Virusproteine der PsHV-Referenzstämmen (Spur 2-6) und der Negativkontrolle (Spur 7) mit dem mittels homogenisierter HEF-Suspension behandelten Kaninchen-Antiserum gegen PsHV 3115/92. In Spur 1 befindet sich ein Molekulargewichtsmarker (Molekulargewichte in kDa siehe Text zur Abb. 25).



5 Diskussion

5.1 Virusidentifikation

Um eine Identifikation der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Virusisolate als Herpesviren vorzunehmen bzw. eine Verwechslung mit Viren anderer Familien auszuschließen, wurden durch eigene und frühere diagnostische Untersuchungen (vgl. hierzu Punkt 3.2.1) bestimmte morphologische, physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften nachgewiesen.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden Partikel gefunden, die aufgrund ihrer Morphologie und Größe als herpesvirusähnlich angesprochen werden können. Das Vorkommen von Virionen, bei denen 2 Kapside von einer gemeinsamen Hülle umgeben werden, ist bei Herpesviren relativ häufig anzutreffen (BOLLER, persönliche Mitteilung, 2004).

Alle hier untersuchten Virusisolate erweisen sich als chloroformempfindlich, da eine Behandlung mit 10%igem Chloroform eine vollständige Zerstörung der Infektiosität bewirkt. Dadurch wird der Nachweis erbracht, daß es sich um Viren mit lipidhaltiger Hülle handelt (FENNER et al., 1993).

Die Kultivierung unter Zusatz von 50 µg/ml IUDR führt zu einer Hemmung der Virusvermehrung um den Faktor 10^1 bis 10^2 . Daher handelt es sich um DNA-haltige Viren. Gleiches wird durch die für die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und die PCR notwendigen Nukleinsäureextraktionen belegt, da nach dem Verdau mit RNase noch Nukleinsäure vorhanden ist bzw. nur DNA zurückbleibt, welche dann nach Durchführung der genannten Untersuchungsmethoden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Transillumination visualisiert wird.

Folglich ist zu sagen, daß durch die beschriebenen Untersuchungen RNA-Viren sowie unbehüllte DNA-Viren der Familien Adeno-, Papova-, Parvo- und Circoviridae ausgeschlossen werden können. Die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigt zudem das Vorhandensein von sphärischen Virionen mit ikosaedrischem Kapsid einer Größe von ca. 100 nm, welches von einer großen, weiten Hülle umgeben ist (vgl. Abb. 4 und 5).

Aus den Daten der Tabelle 12 wird deutlich, daß die Virusisolierung aus homogenisiertem Organmaterial von Lunge und Herz wesentlich häufiger gelang als aus den anderen im Rahmen der Diagnostik untersuchten Organen. Die Isolierungsraten aus Leber-, Milz, Nieren- und Darmgewebe waren in der angegebenen Reihenfolge absteigend geringer und bei den untersuchten Gehirnhomogenisaten gelang die Anzüchtung nur verhältnismäßig selten. Diese Befunde decken sich weitestgehend mit denen von ESKENS et al. (1994), die bei 31 an PPD gestorbenen Psittaziden eine virologische Untersuchung durchführten und dabei die Anzüchtbarkeit des PsHV aus homogenisiertem Gewebematerial von Herz, Leber, Milz, Niere, Lunge, Darm und Drüsenmagen untersuchten. Auch ESKENS et al. gelang eine Virusisolierung besonders häufig in HEF-Kulturen, die mit homogenisiertem Herz- oder Lungengewebe inokuliert waren. Die Anzüchtung aus Milz und Leber war deutlich weniger erfolgreich und bei den untersuchten Proben aus Niere, Drüsenmagen und Darmgewebe gelang sie nur relativ selten. Gehirnmateriale wurde von ESKENS et al. (1994) nicht untersucht. Die eigenen niedrigen Isolierungsraten bei den untersuchten Gehirnproben stehen dagegen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen von GRAVENDYCK et al. (1998), die bis zu 52 Organe von insgesamt 18 im Verlauf eines PPD-Ausbruches verendeter Psittaziden auf deren Virusgehalt untersuchten und bei allen Proben aus dem Bereich des Kleinhirns sowie der Mehrzahl aller aus dem Bereich des verlängerten Rückenmarkes entnommenen Proben Virus anzüchten konnten. Beim Vergleich der bei den übrigen Organen von GRAVENDYCK et al. (1998) gefundenen Resultate zeigt sich jedoch eine deutliche Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, da den Autoren eine Virusisolierung aus der Lunge in allen und aus dem Herz in über 90% aller Fälle gelang und Proben aus dem unteren Verdauungstrakt sich dagegen zu einem relativ hohen Prozentsatz als PsHV-negativ erwiesen. Bei der Auswahl der in der praktischen

virologischen Diagnostik zu untersuchenden Organe sollten diese Unterschiede auf jeden Fall berücksichtigt werden.

Alle Isolate zeigen in HEF-Kulturen einen lichtmikroskopisch deutlich sichtbaren, für Psittaziden-Herpesviren charakteristischen cpE mit Bildung von zunächst herdförmig gelegenen, in der Größe variierenden abgerundeten Zellen sowie diffuser Verteilung dieser rundlichen Zellen und Zelllyse in den späteren Infektionsstadien. Bei einigen Isolaten treten zusätzlich vergrößerte Zellen auf, die sich zu Synzytien entwickeln (vgl. Tabelle 14). Die Zeitspanne vom Auftreten des cpEs bis zur mehr oder weniger vollständigen Zerstörung des Zellrasens der an die Zellkultur adaptierten Virusisolate (2 bis 5 Tage; Ausnahme 11 Tage bei Isolat 279/00) ist für Psittaziden-Herpesviren (EHRSAM et al., 1978; HIRAI et al., 1979; CHO und McDONALD, 1980; KALETA et al., 1980b) im Unterschied zu anderen Herpesviren aviären Ursprungs (HEINRICHS, 1992) als charakteristisch anzusehen. Dabei bestätigt sich weitestgehend die von SPENKOCHE-PIPER (1993) beobachtete Korrelation des cpE mit der serologischen Gruppierung. Die Autorin teilte die von ihr untersuchten PsHV-Isolate in drei Serogruppen ein, wobei Vertreter der Serogruppe 2 (repräsentiert u.a. durch PsHV-Isolat 6840/87) einen durch große runde Zellen und Synzytien gekennzeichneten cpE hervorriefen. Vertreter der Serogruppen 1 (repräsentiert u.a. durch PsHV-Isolat KS144/79) und 3 (repräsentiert durch PsHV-Isolat 3115/88) induzierten oft die Bildung von kleinen runden Zellen und seltener auch kleinen Synzytien. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolaten fällt übereinstimmend mit den Ergebnissen von SPENKOCHE-PIPER (1993) auf, daß die in HEF-Kulturen beobachteten Unterschiede der zytopathischen Effekte weitestgehend mit der serologischen Einteilung korrelieren. Dementsprechend verursachen die der Serogruppe PsHV-2 zugeordneten Isolate 564/99, 661/01, 663/01, 670/01 und 54/01 ein schnelles Auftreten von großen abgerundeten Zellen und Synzytien über den gesamten Beobachtungszeitraum, wohingegen das Isolat 131/01, welches serologisch dem Subtyp PsHV-1 entspricht, durch einen cpE mit sehr kleinen runden Zellen und wenigen kleinen Synzytien gekennzeichnet ist. Der durch die dem serologischen Subtyp PsHV-3 zugeordneten Isolate 862/98, 2009/99 und 2490/00 induzierte cpE entsteht langsamer und tritt zuerst in Form von vereinzelt

herdförmigen Arealen mit kleinen, abgerundeten Zellen auf, welche erst nach 3 bis 5 Tagen konfluieren und sich dann über den gesamten Zellrasen ausbreiten. Der cpE des Isolates 279/00 ähnelt morphologisch demjenigen der anderen dem serologischen Subtyp PsHV-3 zugeordneten Isolate, ist aber in seiner Ausbreitungsgeschwindigkeit viel langsamer und tritt erst am Tag 9 p. inf. auf. Dies ist evtl. durch einen im Vergleich zu den anderen Isolaten niedrigeren Infektionstiter zu erklären. Das Isolat 279/00 wurde aus dem operativ entfernten Gewebe eines Kloakenpapilloms eines zum Zeitpunkt der Untersuchung noch lebendigen, nicht virämischen Tieres isoliert. Somit war die in dem Papillom enthaltene Ausgangsvirusmenge viel geringer als diejenige der Organe von an PPD gestorbenen Psittaziden, aus denen alle anderen Isolate gewonnen worden sind. Zur Beurteilung der Art und Morphologie der zytopathischen Effekte wurde von jedem Isolat die 8. Passage auf HEF-Kulturen in einer Infektionsdosis von $10^{5,5}$ bis $10^{6,0}$ GKID₅₀/ml eingesetzt. Bei Isolat 279/00 lag der Ausgangstiter der 8. Passage jedoch nur bei $10^{4,2}$ GKID₅₀/ml, so daß evtl. eine weitere Passagierung des Isolates zur besseren Adaptation an die HEF-Kultur oder eine Konzentrierung der eingesetzten Ausgangsvirus suspension hilfreich gewesen wäre, um den Infektionstiter an denjenigen der anderen PsHV-Isolate anzupassen und die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Isolates objektiv beurteilen zu können.

Die Isolate 3112/97, 2753/98, 180/01 sowie 181/01 konnten serologisch sowohl dem Subtyp PsHV-4 als auch PsHV-5 zugeordnet werden und induzieren einen sich schnell über den gesamten Zellrasen verteilenden cpE mit kleinen abgerundeten Zellen und kleinen Synzytien. Auffällig ist das Verhalten des als Referenzvirus für den Subtyp PsHV-5 eingesetzten Isolates 8326/87. Entgegen den Beobachtungen von SPENKOCH-PIPER (1993) und GÜNTHER (1995) unterscheidet sich das Isolat 8326/87 im Hinblick auf seine Ausbreitungsgeschwindigkeit nicht von den o.g. Isolaten. Es zeigt bei den eigenen Versuchen eine schnelle Ausbreitungsgeschwindigkeit mit Bildung von kleinen runden Zellen und Synzytien in diffuser Verteilung. Das von GÜNTHER (1995) beschriebene Vorkommen eines Stagnationsstadiums von bis zu 5 Tagen bei der Ausbreitung des cpE kann anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden, da sich der cpE bereits 3 Tage p. inf. über den

gesamten Zellrasen verteilt und 5 Tage p. inf. ca. 60% des Zellrasens zerstört war mit Auftreten von massenhaft kleinen runden Zellen im Überstand.

Der durch die untersuchten Virusisolate verursachte CPE läßt sich mit in Kaninchen produzierten Antiseren gegen die 5 verschiedenen serologischen PsHV-Subtypen nach GRAVENDYCK et al. (1996) je nach serologischer Verwandtschaft bis zu 100% neutralisieren.

Alle genannten Untersuchungen belegen, daß es sich bei diesen Virusisolaten um Psittaziden-Herpesviren handelt.

5.2 Neutralisationstests in HEF-Kulturen

Für die Beurteilung der serologischen Verwandtschaftsbeziehungen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 14 neuen und 31 sonstigen PsHV-Isolate (vgl. Punkt 3.1.1.1 und 3.1.1.2) zu den bisher etablierten Subtypen werden die aus den Titerergebnissen der Neutralisationstests errechneten PK-Werte herangezogen. Analog zur Vorgehensweise von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) wird bei der Bewertung des PK-Wertes der Einteilung von GIAMBRONE und SOLANO (1988) gefolgt, wonach Virusisolate aufgrund der Höhe ihrer PK-Werte differenziert werden in „nicht verwandt“ (PK-Wert kleiner als 30), „verwandt“ (PK-Wert zwischen 30 und 70) und „serologisch identisch“ (PK-Wert über 70). Demzufolge können 10 der 14 neuen PsHV-Isolate sowie 23 der 31 sonstigen PsHV-Isolate eindeutig den bisher etablierten serologischen Subtypen zugeordnet werden. Insgesamt handelt es dabei um 33 Isolate, von denen aufgrund ihres Neutralisationsverhaltens 10 dem Subtyp 1, 12 dem Subtyp 2 sowie 11 dem Subtyp 3 angehören (vgl. Tabellen 20 und 21). Bei den übrigen 12 Isolaten ist serologisch keine eindeutige Zuordnung bzw. keine Abgrenzung zwischen dem Subtyp 4 und 5 möglich, da diese durch die Antiseren gegen PsHV-4 und PsHV-5 in gleichem Maße neutralisiert werden und somit antigenetische Gemeinsamkeiten mit beiden Subtypen zeigen. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß diese 12 Isolate eine Mischpopulation aus PsHV

vom Subtyp 4 und solchen von Subtyp 5 darstellen oder aber antigenetische Eigenschaften beider Subtypen besitzen. Erstere Möglichkeit ist jedoch unwahrscheinlich, da alle Isolate vor der Vermehrung durch Endpunkttitration gereinigt wurden und, sofern durchgeführt, bei der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen klare Bandenmuster zeigen. Gegen die zweite Möglichkeit spricht, daß die PK-Werte aller 12 Isolate für die Neutralisation mit beiden Subtypen nicht grenzwertig, sondern deutlich größer als 70 sind. Es fällt auf, dass keines der insgesamt 45 untersuchten Isolate eindeutig nur dem Subtyp 4 oder nur dem Subtyp 5 zuzuordnen ist. Es muß daher auch ein Zusammenhang mit den eingesetzten Kaninchen-Antiseren gegen PsHV-4 und PsHV-5, z.B. ein Fehler bei deren Herstellung oder eine Kontamination der zu deren Produktion verwendeten Referenzviren 1483/92 oder 8326/87 in Betracht gezogen werden (vgl. auch Punkt 5.4)

5.3 Restriktionsenzymanalyse

Die anhand der erhaltenen Bandenmuster bei der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen vorgenommene Einordnung der in der Tabelle 3 unter Punkt 3.1.1.1 aufgelisteten neuen PsHV-Isolate in Restriktionsgruppen zeigen bis auf eine Ausnahme Übereinstimmung mit deren serologischer Einteilung, wobei durch die Restriktionsenzymanalyse eine weitergehende Differenzierung in Untergruppen möglich ist (vgl. Tabelle 29).

Das Isolat 131/01 wurde serologisch dem Subtyp PsHV-1 zugeordnet, während seine 3 auswertbaren Bandenmuster identisch waren mit denen der Isolate 180/01 und 181/01 (Serosubtyp PsHV-4 o.-5). Aus diesem Grund wurde das Isolat 131/01 zusammen mit den Isolaten 180/01 und 181/01 in die Restriktionsgruppe bzw. -untergruppe A4 eingeteilt. Das bei allen Restriktionsendonukleasespaltungen als Referenzvirus für den serologischen Subtyp PsHV-1 mitgeführte Isolat KS 144/79 wird dagegen analog zu den Ergebnissen von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) in die Restriktionsgruppe A1 eingeteilt. SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) untersuchte insgesamt 16 Isolate, welche serologisch dem Subtyp PsHV-1 zugeordnet werden konnten. Diese 16 Isolate

ließen sich anhand ihrer Restriktionsmuster in die beiden Untergruppen A1 und A2 einteilen. Das Isolat 131/01 sollte nochmals serologisch und mittels Spaltung durch Restriktionsendonukleasen überprüft werden, bevor eine endgültige Entscheidung über seine Zugehörigkeit getroffen werden kann. Für eine Wiederholung der serologischen Untersuchung wäre aufgrund der unter Punkt 4.2.1.2.1 beschriebenen Problematik die Herstellung eines neuen Antiserums mit einem höheren Gehalt an neutralisierenden Antikörpern gegen das als Referenzvirus für den serologischen Subtyp 4 verwendeten PsHV 1483/90 notwendig.

Bei den 14 untersuchten Virusisolaten konnten insgesamt 9 verschiedene Fragmentmuster unterschieden werden. Keines der gefundenen Spaltmuster zeigte Gemeinsamkeiten mit denen von Herpesviren, die bei anderen, nicht der Ordnung *Psittaciformes* zugehörigen Vögeln beschrieben wurden (GÜNTHER, 1995; GRAVENDYCK, 1996; GÜNTHER et al., 1997).

SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) konnte die von ihr untersuchten 30 PsHV-Isolate in insgesamt 7 verschiedene Restriktionsgruppen und innerhalb derer in weitere Untergruppen einteilen. Jedes der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolate konnte einer der von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) etablierten Restriktionsgruppen zugeordnet werden, wobei bei der Auswertung der Bandenmuster der Vorgehensweise der Autorin gefolgt wurde. Die hier untersuchten Isolate verteilen sich auf die 3 Gruppen A, B und C; den Gruppen D, E, F oder G wurde keines der hier untersuchten Isolate zugeordnet.

Isolate, die während eines PPD-Seuchenzuges aus verschiedenen Tieren des gleichen Bestandes isoliert worden sind, zeigen ein identisches Fragmentmuster. Es handelt sich dabei um die Isolate 180/01 und 181/01 aus Bestand E (Restriktionsgruppe A4.1) sowie 670/01 und 661/01 aus Bestand F (Restriktionsgruppe B4). Diese Anzahl an untersuchten Proben ist zu gering, um eine gesicherte Aussage treffen zu können; jedoch kann die Vermutung formuliert werden, daß in diesen Ausbrüchen jeweils nur ein einziger Virusstamm beteiligt war. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch mehrere PsHV gleichzeitig in einem Bestand vorkommen und einen Krankheitsausbruch verursachen können. Auch SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999)

konnte bei einer Anzahl von einmal 2 und einmal 3 Isolaten, die während eines PPD-Ausbruches aus dem gleichen Bestand isoliert wurden, keinen Unterschied im Bandenmuster ihrer DNA feststellen. Damit decken sich die Ergebnisse der Autorin mit den hier beschriebenen Befunden und festigen die oben geäußerte Annahme, daß für einen PPD-Ausbruch jeweils nur ein PsHV verantwortlich zu sein scheint.

Die drei Isolate 2753/98, 2009/99 und 2490/00 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem Abstand von jeweils ca. einem Jahr aus demselben Bestand (Bestand B) isoliert. Hierbei fällt auf, daß das Isolat 2753/98 sich sowohl serologisch als auch im Hinblick auf das nach Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen erhaltene Bandenmuster seiner DNA deutlich von den Isolaten 2009/99 und 2490/00 unterscheidet, wohingegen zwischen den beiden letztgenannten Isolaten keine Unterschiede festzustellen sind. Das während des ersten Seuchenzuges im Jahr 1998 im Bestand B aus den Organen einer Taubenhalsamazone (*A. vinacea*) isolierte PsHV 2753/98 ist antigenetisch (Serosubtyp PsHV-4 o. -5) sowie aufgrund der Ergebnisse der Restriktionszymanalyse (Restriktionsgruppe A3) identisch mit dem als Referenzvirus für den serologischen Subtyp PsHV-4 eingesetzten Isolat 1483/90. Die Ergebnisse der Restriktionszymanalyse und die Zuordnung zur Untergruppe A3 sind jedoch, wie unter Punkt 4.3.2 beschrieben, nur bedingt als aussagekräftig anzusehen, da bei Isolat 2753/98 nur die Bandenmuster nach Spaltung mit den Endonukleasen *XhoI* und *Eco RI* auswertbar waren.

Die in den Jahren 1999 bzw. 2000 im Bestand B isolierten PsHV 2009/99 und 2490/00 dagegen werden serologisch dem Subtyp PsHV-3 zugeordnet und zeigen bei den Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen sowohl untereinander als auch mit dem als Referenzvirus für den Subtyp PsHV-3 verwendeten Isolat 3115/88 ein identisches Fragmentmuster ihrer DNA. Die beiden Isolate werden demzufolge analog zum Referenzvirus 3115/88 der Restriktionsgruppe C1.1 zugeordnet.

Aufgrund der genannten Unterschiede kann bei dem zweiten PPD-Ausbruch im Jahr 1999 von einer Neuinfektion ausgegangen werden. Da es sich bei dem Bestand B nicht um einen geschlossenen Zuchtbestand handelt, bleibt offen, ob das Virus durch einen neu in den Bestand importierten Vogel eingeschleppt wurde oder aber durch

Reaktivierung einer latenten Infektion bei einem schon länger in der Haltung befindlichen Trägertier aufgetreten ist. Nach dem zweiten Seuchenzug im Jahr 1999 wurden alle noch nicht erkrankten Tiere im Bestand einer Notimpfung mit einer durch Formalin und Hitze inaktivierten Vakzine, hergestellt aus Isolat 2009/99 in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität in Gießen, unterzogen. Im Bestand wurden außerdem allgemeine seuchenhygienische Maßnahmen wie Quarantänisierung der Neuzugänge und hygienisches Management mit regelmäßiger Reinigung und Desinfektion der Räume und des Futterschirrs eingeführt. Nach der Vakzinierung kam es zum Ende der PPD-Endemie, so dass der zum Zeitpunkt der Impfung verbleibende Restbestand erhalten werden konnte. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von KALETA und BRINKMANN (1993), STEINKE und MUNDT (1997) sowie SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999), die nach Impfungen mit einem bestandsspezifischen Impfstoff in insgesamt 6 verschiedenen Beständen über einen Beobachtungszeitraum von mehreren Monaten alle Vögel als klinisch gesund beschreiben. In der Folgezeit wurden alle Neuzugänge während der Quarantänezeit mit dem oben beschriebenen inaktivierten Impfstoff geimpft, und es erfolgte eine regelmäßige Revakzination aller in der Haltung befindlichen Tiere. Sechs Tage nach einer solchen Wiederholungsimpfung im Jahr 2000 zeigte eine Kubaamazone (*A. leucocephala leucocephala*) zuerst unspezifische (Apathie, gestäubtes Gefieder), dann spezifische Krankheitssymptome der PPD wie Diarrhoe und Polyurie und verendete am Tag darauf. Aus den Organen dieses Tieres wurde das PsHV 2490/00 isoliert. Diese anamnestischen Informationen führen zu der Frage, ob der verwendete Impfstoff aufgrund einer unvollständigen Inaktivierung noch infektiöses PsHV enthielt. Die nach der Herstellung des Impfstoffes durchgeführte Inaktivierungskontrolle sowie die Tatsache, daß nur ein einziges Tier erkrankte, sprechen jedoch gegen diese Annahme. Zum Zeitpunkt des zweiten PPD-Seuchenzuges wurde die Kubaamazone bereits im Bestand B gehalten und überlebte als Kontakttier ohne Krankheitssymptome. Aus diesem Grunde liegt die Vermutung nahe, daß das Tier seit der PPD-Endemie im Jahr 1999 inapparenter Träger des Virus war und durch den durch die Manipulationen während der Impfung verursachten Streß eine Reaktivierung der latenten Infektion erfolgte. Da das PsHV 2009/99, welches zur Impfstoffherstellung verwendet wurde,

weder serologisch noch anhand der Fragmentmuster seiner mittels Restriktionsendonukleasen gespaltenen DNA von dem aus den Organen der Kubaamazonen isolierten Virus 2490/00 unterschieden werden kann, ist es wahrscheinlich, daß der durch die bisherigen Impfungen aufgebaute Schutz in diesem Individualtier entweder nur unvollständig entwickelt war oder aber das Impfintervall von mehr als einem Jahr zu groß war, um eine ausreichende Immunabwehr aufrechtzuerhalten.

Bei den beiden Isolaten 3112/97 und 564/99 handelt es sich ebenfalls um PsHV, die nacheinander im Abstand von ca. zwei Jahren bei jeweils getrennten Seuchenausbrüchen aus demselben Bestand (Bestand A) isoliert wurden. Es kann aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen belegt werden, dass bei dem zweiten Ausbruch im Jahr 1999, in dessen Folge 12 Psittaziden starben, eine Neuinfektion stattgefunden haben muß, da sowohl die serologischen Eigenschaften als auch das Spaltpattern der DNA des Isolates 564/99 (PsHV-Subtyp 2; Restriktionsgruppe B3) vollkommen verschieden von dem während des ersten Ausbruches im Jahr 1997 isolierten PsHV 3112/97 (PsHV-Subtyp 4 o. 5; Restriktionsgruppe B3) sind. Bei dem Bestand A ist als Besonderheit zu erwähnen, dass es sich um eine spanische Sammelstelle und Quarantänestation zum Import von Psittaziden aus verschiedenen Kontinenten nach Europa handelt (vgl. Tabelle 2). Viele Autoren beobachteten PPD-Krankheitsausbrüche im Zusammenhang mit kürzlich importierten Vögeln, wobei der durch den Transport und die veränderten Umgebungsbedingungen verursachte Stress den Ausbruch einer latenten Infektion begünstigt (SIMPSON und HANLEY, 1975; WINTEROLL, 1977; EHRSAM et al., 1978; MEULEMANS et al., 1978; MILLER et al., 1979; RANDALL et al., 1979; KALETA et al., 1980; GILBERT et al., 1984). Nach dem Seuchenzug im Jahr 1997 wurde aus dem aus dem Isolat 3112/97, wie bereits oben für Bestand B beschrieben, ein homologer inaktivierter Impfstoff hergestellt, mit dem alle zu dieser Zeit in der Sammelstelle befindlichen Psittaziden sowie alle Neuimporte kurz nach deren Ankunft vakziniert wurden. Da das beim zweiten Ausbruch isolierte PsHV 564/99 große serologische und antigenetische Unterschiede zu dem zur Impfstoffherstellung

verwendeten Isolat 3112/97 aufweist, ist es wahrscheinlich, dass der durch die bisherigen Impfungen aufgebaute Schutz im Bestand A nur gegen Subtyp 4 o. 5, nicht aber gegen Subtyp 2 ausreichte. Derartige fehlende Kreuzprotektion wird auch von anderen Autoren berichtet (MAGNINO et al., 1996; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999).

5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Insgesamt wurden 9 verschiedene PCR-Varianten bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PsHV-Isolaten beobachtet (vgl. Tabelle 28), wobei nicht alle Varianten in gleicher Häufigkeit vorkommen. Der überwiegende Teil aller Isolate zeigt die Amplifizierungsmuster der Varianten 1 bis 4 bzw. 5, wobei deren Numerierung analog zu den bei der vergleichenden Untersuchung der „Referenzviren“ für die 5 serologischen Subtypen (nach GRAVENDYCK et al., 1996) gefundenen Amplifizierungsmustern erfolgte. Die Amplifizierungsmuster der Varianten 6 bis 9 wurden jeweils bei nur einem Isolat gefunden (vgl. Tabelle 27). Es fällt auf, daß die als Referenzviren für die Serosubtypen 4 und 5 eingesetzten Isolate 1483/92 und 8326/87 ein identisches Amplifizierungsmuster aufweisen. Die beiden Isolate lassen sich außerdem weder anhand ihres Zellkulturverhaltens noch serologisch noch anhand des Fragmentmusters ihrer mittels Restriktionsenzymen gespaltenen DNA voneinander unterscheiden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen verschiedener anderer Autoren (SPENKOCH-PIPER, 1993; TRITT, 1995; GÜNTHER, 1995; GRAVENDYCK, 1996; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999), die das Isolat 8326/87 serologisch klar einem eigenen Subtyp, dem PsHV-5, zuordnen können. Diese Sonderstellung wurde von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) auch durch Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen bestätigt. Aufgrund der eigenen gegensätzlichen Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich, daß bei dem in dieser Arbeit verwendeten Isolat 8326/87 bereits zu Beginn der Untersuchungen entweder eine Laborverwechslung oder aber eine Kontamination mit dem PsHV-Isolat 1483/92 bzw. einem anderen PsHV-Isolat vom serologischen Subtyp 4 stattgefunden hat. Grund und genauer Zeitpunkt

dieser Verwechslung bzw. Kontamination sind im Nachhinein jedoch nur sehr schwer genau zu eruieren.

Die anhand der sich darstellenden unterschiedlichen Amplifizierungsmuster vorgenommene Einordnung der in der Tabelle 3 unter Punkt 3.1.1.1 aufgelisteten neuen PsHV-Isolate in PCR-Varianten deckt sich ausnahmslos mit deren serologischer Einteilung (vgl. Tabelle 30). Beim Vergleich der PCR-Varianten mit den Ergebnissen der bei diesen Isolaten ebenfalls durchgeführten Restriktionsenzymanalyse findet sich auch eine große Übereinstimmung. Lediglich bei Isolat 131/01 zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse, da dieses Isolat aufgrund des gefundenen Amplifizierungsmusters analog zu den Ergebnissen der serologischen Untersuchung (PsHV-Subtyp 1) der Variante 1 zugeordnet wird, das Spaltmuster seiner DNA jedoch identisch ist mit demjenigen der Isolate 180/01 und 181/01 (Restriktionsgruppe A4, serologischer Subtyp 4 o. 5). Um eine eindeutige Aussage zur Zugehörigkeit dieses Isolates treffen zu können, müssten die genannten Untersuchungsmethoden wiederholt bzw. weiterführende Genomanalysen durchgeführt werden.

Die 31 in der Tabelle 3 aufgelisteten sonstigen PsHV-Isolate wurden serologisch sowie mittels PCR untersucht. Dabei war bei 23 Isolaten die serologische Einteilung vollkommen übereinstimmend mit der Zuordnung zu PCR-Varianten. Bei 8 Isolaten dagegen zeigten sich Unterschiede, wobei eine Gruppe von 3 Isolaten serologisch dem Subtyp 1, anhand der gefundenen Amplifizierungsmuster jedoch der Variante 4 o. 5 zugeordnet wurden. Bei diesen 3 Herpesvirusisolaten sollte die serologische Einteilung nochmals überprüft werden, ggf. mit einem neu hergestellten Antiserum gegen den serologischen Subtyp PsHV-4. Jedes der übrigen 5 Isolate konnte serologisch einem der 5 bisher etablierten Subtypen, nicht aber einer der Varianten 1 bis 5 zugeordnet werden. Alle 5 Isolate zeigten ein von den Varianten 1 bis 5 verschiedenes Amplifizierungsmuster und wurden daher als Varianten 6 bis 9 beziffert. Eine fehlende DNA-Amplifizierung führt zu der Schlußfolgerung, daß die Sequenz der Primerpaare sich so stark von der zu untersuchenden Ziel-DNA unterscheidet, daß ein „Annealing“ nicht möglich ist. Durch die PCR können demzufolge 5 Isolate, die serologisch keine

Unterschiede zu den 5 etablierten Subtypen aufweisen, weitergehend differenziert werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von TOMASZEWSKI et al. (2001), die mit dem Primerpaar 23F bei 53 von 54 Proben ein Amplifikat nachweisen konnten, gelang dies bei den eigenen Untersuchungen bei nur 35 von insgesamt 50 untersuchten Isolaten. Unter Verwendung des Primerpaares 9F waren jedoch bei allen untersuchten Isolaten Amplifikate in den erwarteten Längenbereichen vorhanden (vgl. Tabellen 25 und 26). Der Vorschlag von TOMASZEWSKI et al. (2001), das Primerpaar 23F alleine als ein sensitives Mittel zur Diagnose von PsHV in Organproben oder Zellkulturüberstand bzw. in Tupferproben lebender Tiere zu verwenden, kann aufgrund der hier gefundenen Resultate nicht als sinnvoll erachtet werden.

Bei den untersuchten Isolaten konnte keine Speziespezifität in Bezug auf die genannte Gruppierung festgestellt werden (vgl. Tabelle 32). Von insgesamt 11 PsHV, welche aus Blaustirnamazonen (*A. aestiva aestiva*) isoliert wurden, wurden 2 dem serologischen Subtyp PsHV-1, 2 dem Subtyp PsHV-2, 3 dem Subtyp PsHV-3 und 4 PsHV dem serologischen Subtyp 4 o. 5 zugeordnet. Nach Durchführung der PCR zeigen die 11 Isolate aus Blaustirnamazonen 4 verschiedene Amplifizierungsmuster und bei den 3 PsHV 2009/99, 279/00 und 661/01 wurden nach Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen 3 unterschiedliche Bandenmuster gefunden. Diese Befunde decken sich mit denen von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999), die ebenfalls keine Übereinstimmung zwischen Spezies und Gruppenzugehörigkeit bei den von ihr untersuchten Isolaten feststellen konnte. Die von TOMASZEWSKI et al. (2001) geäußerte Vermutung, daß Isolate aus Graupapageien (*Psittacus erithacus erithacus*) mit größerer Häufigkeit seltene PCR-Varianten repräsentieren, kann aufgrund der eigenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Von 6 Isolaten aus Graupapageien konnten 5 den am häufigsten vorkommenden PCR-Varianten 1 bis 5 und nur das PsHV 1639/87 der seltenen, einzig durch dieses Isolat repräsentierten PCR-Variante 6 zugeordnet werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Herpesviren stammen aus den Jahren 1982 bis 2001. Bei Betrachtung von mehreren Isolaten aus demselben Jahr kommen sowohl

verschiedene serologische Subtypen als auch verschiedene Restriktionsspaltmuster und PCR-Varianten vor. So können z.B. die Isolate 180/01, 54/01 und 131/01 den serologischen Subtypen und PCR-Varianten 4 o. 5, 2 sowie 1 und den Restriktionsgruppen A 4.1, B5 sowie A4 zugeordnet werden. Es kann daher von einem gleichzeitigen Vorkommen von unterschiedlichen Genotypen mit unterschiedlichen serologischen Eigenschaften ausgegangen werden. Andererseits erscheint es beim Vergleich der Isolate aus verschiedenen Jahren bemerkenswert, dass z.B. das PsHV 6090/82, welches im Jahr 1982 isoliert wurde, serologisch sowie aufgrund des Amplifizierungsmusters seiner DNA nach Durchführung der PCR identisch ist mit dem PsHV 180/01, dessen Isolierung 19 Jahre später im Jahr 2001 erfolgte. Die DNA des als Referenz für den serologischen Subtyp 3 eingesetzten Herpesvirus 3115/88 zeigt nach Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen das gleiche Bandenmuster wie die beiden Isolate 2009/99 und 2490/00 aus den Jahren 1999 und 2000. Es kann daher von einer hohen genetischen Stabilität der Virus-DNA bei PsHV ausgegangen werden. Bemerkenswert ist außerdem, dass das o.g. älteste Isolat 6090/82 dem serologischen Subtyp sowie der PCR-Variante 4 o. 5 zugeordnet wurde. Dies bedeutet, dass bereits im Jahre 1982 in Deutschland PsHV vorkamen, die serologisch und genetisch von dem drei Jahre zuvor isolierten PsHV KS 144/79 differenzierbar sind. Bislang wurde angenommen, daß dem Isolat KS 144/79 genetisch und serologisch verwandte Herpesviren seit 1979 in den Papageienpopulationen vorkommen (SPENKOCH-PIPER, 1993). Erst seit 1987 sind andere serologische Subtypen in Deutschland nachgewiesen worden (KRAUTWALD et al., 1988a; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999). Die oben beschriebene Einordnung des Isolates 6090/82 zum serologischen Subtyp PsHV-4 o. 5 führt dagegen zu der Annahme, daß PsHV mit unterschiedlichen Sero- und Genotypen schon wenige Jahre nach dem ersten Auftreten von PPD-Ausbrüchen in Deutschland (WINTERROLL, 1977; KALETA et al., 1980b) existierten.

Die Prävalenzen der einzelnen Sero- und Genotypen innerhalb der hier untersuchten Isolate unterscheidet sich von den Prävalenzen, die von verschiedenen anderen Autoren gefunden wurden (TRITT, 1995; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999; TOMASZEWSKI et al., 2001; TOMASZEWSKI et al., 2003) insofern, als daß der

serologische Subtyp PsHV-1 nicht die höchste Prävalenz hat. SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) konnte 15 von 31 aus Deutschland stammenden, in den Jahren 1979 bis 1996 isolierten PsHV dem Serosubtyp PsHV-1 zuordnen. TOMASZEWSKI et al. berichteten im Jahr 2001 von einer 6 mal häufigeren Identifizierung der PCR-Variante 1 im Vergleich zur nächsthäufigsten Variante, wobei es sich bei den von den Autoren untersuchten PsHV um Isolate aus den USA handelte. Die Auswertung der eigenen Ergebnisse ergibt eine relativ gleichmäßige Häufigkeit des Vorkommens aller 4 serologischen Subtypen (PsHV-1: 22%, PsHV-2: 27%, PsHV-3: 24%, PsHV-4 o.5: 27%, vgl. Abb. 8). Die Prävalenz der PCR-Varianten verteilt sich mit 9% auf Variante Nr. 1, 24% auf Variante Nr. 2, 18% auf Variante Nr. 3, 37% auf Variante Nr. 4 bzw. 5 und 8% auf die seltenen Varianten 6 bis 9. Ob diese Befunde aussagekräftig im Hinblick auf eine wirkliche Verschiebung der Prävalenzen sind oder ob sie das Ergebnis einer zu geringen Anzahl an untersuchten Proben darstellen, muß durch zusätzliche Untersuchungen geklärt werden.

Folglich kann festgehalten werden, daß die PsHV als Erreger der PPD eine serologisch und genetisch heterogene Gruppe darstellen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolaten, welche innerhalb eines Zeitraumes von 19 Jahren isoliert wurden und größtenteils aus Deutschland stammen, können 4 verschiedene Serotypen und mindestens 4 verschiedene Genotypen unterschieden werden. Wie schon von verschiedenen anderen Autoren gefordert (MAGNINO et al., 1996; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999; TOMASZEWSKI et al., 2001 und 2003, verdeutlicht dieser Befund die Notwendigkeit, in Zukunft bei einer möglichen Impfstoffentwicklung eine tetravalente Vakzine herzustellen, die gegen alle vorkommenden Serotypen schützt.

5.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Ziel dieser Untersuchungen war der Vergleich bzw. das Auffinden von Unterschieden zwischen den als Referenzstämmen für die 5 serologischen Subtypen nach GRAVENDYCK et al. (1996) verwendeten PsHV-Isolaten auf Proteinebene. Dabei stellte sich heraus, daß eine Unterscheidung der Proteinmuster nach Auftrennung der

Antigene mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgrund der Vielzahl an dargestellten Banden sowie der nahezu vollständigen Übereinstimmung der „Proteinfingerprints“ aller 5 PsHV-Isolate sowohl untereinander als auch mit der Negativkontrolle (Abb. 25) nicht möglich war. Um die PsHV-spezifischen Antigene besser darstellen zu können, müßte die Methode zur Extraktion der viralen Proteine aus der infizierten Zellkultur (vgl. Punkt 3.2.5.1) im Hinblick auf eine verbesserte Aufreinigung der PsHV-Antigene wiederholt und modifiziert werden. Der gewählte Versuchsaufbau des Western Blots erwies sich wegen starker Reaktivität der polyklonalen Seren mit Zellproteinen ebenfalls als ungeeignet, um virusspezifische Proteine nachweisen zu können. Der Versuch, die unspezifischen, gegen die Zellproteine gerichteten Antikörper mittels Inkubation mit einer homogenisierten HEF-Suspension zu neutralisieren, erbrachte keine Verbesserung.

Für zukünftige Untersuchungen erscheint es zweifelhaft, ob durch IgG-Aufreinigung der Kaninchen-Antiseren mittels einer Protein G-Sepharose Säule die unspezifischen Hintergrundreaktionen im Western Blot vermindert werden können. Sinnvoller für zukünftige Versuchsansätze erscheint der Einsatz von in Hühnern hergestellten Hyperimmunseren oder auch Ei-Antikörpern, um die Bildung von gegen HEF-gerichteten Antikörpern auszuschließen. Des weiteren sollten Versuche zur Ermittlung der geeignetsten Blocksubstanzen durchgeführt werden. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit nicht in ausreichendem Maße geschehen. Die eingesetzte Blocksubstanz kann einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Unterdrückung unspezifischer Reaktionen von Seren sowie die Reduktion der nicht antigenassoziierten Schwärzung der Nitrozellulosemembran haben. Folglich ist zu sagen, daß sich PAGE und Western Blot im hier gewählten Versuchsaufbau nicht zum Nachweis und zum Vergleich virusspezifischer Antigene eignen.

5.6 Vorschläge zur Taxonomie der Herpesviren der Psittaziden

Die aufgrund der eigenen Ergebnisse vorgenommene Differenzierung bzw. Gruppierung der untersuchten PsHV-Isolate sowie die Ergebnisse der unter Punkt 5.2 bis 5.4 genannten Autoren geben Anlaß, einen Vorschlag zur Einordnung der PsHV in das universelle System der Virustaxonomie zu entwerfen. Dieses universelle Schema wurde von einer im Jahre 1966 unter dem Namen „International Committee on Nomenclature of Viruses“ (ICNV) gegründeten und später zu ICTV „International Committee on Taxonomy of Viruses“ umbenannten Expertengruppe entwickelt und umfasst die hierarchischen Ebenen Ordnung, Familie, Unterfamilie, Genus und Spezies (WILDLY, 1971; MATTHEWS, 1983). Im siebten und damit bislang jüngsten Bericht des ICTV (MINSON et al., 2000) wird die Gruppe der PsHV als nicht zugeordnetes Mitglied der Subfamilie Alphaherpesvirinae unter der Bezeichnung Psittacid herpesvirus 1 (parrot herpesvirus) aufgeführt. Bei der hier vorgeschlagenen taxonomischen Gruppierung der PsHV werden die von Van REGENMORTEL (1990) entwickelte und im Jahre 1991 vom ICTV akzeptierte Definition einer Virusspezies sowie die im 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Van REGENMORTEL, 2000) aufgelisteten Kriterien zur Abgrenzung einer Virusspezies berücksichtigt.

Van REGENMORTEL (1990) definiert eine Virusspezies als eine polythetische Gruppe von Viren, die eine replizierende Linie bildet und eine besondere ökologische Nische besiedelt. Als polythetisch wird eine Gruppe bezeichnet, deren Mitglieder fast stets durch mehr als ein einziges Charakteristikum gekennzeichnet sind, wobei keines davon alleine wesentlich oder notwendig ist. Es sollten daher bei einer Entscheidung über die Zuordnung von Virusisolaten zu bestimmten Spezies vorzugsweise mehrere dieser Eigenschaften einbezogen werden. Genera sind den Spezies übergeordnet und stellen Gruppierungen von Virusspezies dar, welche gemeinsame Charakteristika teilen und sich von den anderen Genera zugehörigen Viren unterscheiden.

Die folgenden diagnostischen Eigenschaften werden vom ICTV als geeignet zur Abgrenzung von Virusspezies innerhalb eines Genus empfohlen (Van REGENMORTEL, 2000):

- genetische Verwandtschaft (Übereinstimmung der DNA-Sequenzen),
- natürliches Wirtsspektrum,
- Zell- und Gewebetropismus,
- Pathogenität und Zytopathologie,
- Übertragungsweg,
- physikochemische Eigenschaften von Virionen,
- antigene Eigenschaften von viralen Proteinen.

Für verwandte Mitglieder der Familie Herpesviridae gilt, dass sie als unterschiedliche Spezies klassifiziert werden, wenn ihre Nukleotidsequenzen sich auf eine leicht zu untersuchende und bezeichnende Art über das gesamte Genom hinweg voneinander unterscheiden lassen. Darüber hinaus sollten sie verschiedene ökologische Nischen besiedeln, entweder aufgrund verschiedenartiger Epidemiologie und Pathogenese oder unterschiedlicher natürlicher Wirte. In Anbetracht der Diversität der Familie Herpesviridae kann eine Zuordnung auf der Ebene des Genus auch in Abwesenheit von genetischen Daten durch serologische Kreuzreaktion erfolgen (Van REGENMORTEL, 2000).

Unter Berücksichtigung der genannten Kriterien zur Abgrenzung von Virusspezies wird für die PsHV folgende Benennung bzw. Gruppierung vorgeschlagen:

Familie Herpesviridae

Subfamilie Alphaherpesvirinae

nov. **Genus** Pachecovirus (Pacheco's Parrot Disease-like Viruses)

mit **type species**: Psittacid herpesvirus 1 (PsHV-1)

nov. **Species** Psittacid herpesvirus 1 (PsHV-1; Pacheco's Parrot Disease Virus 1)

nov. **Species** Psittacid herpesvirus 2 (PsHV-2; Pacheco's Parrot Disease Virus 2)

nov. **Species** Psittacid herpesvirus 3 (PsHV-3; Pacheco's Parrot Disease Virus 3)

nov. **Species** Psittacid herpesvirus 4 (PsHV-4; Pacheco's Parrot Disease Virus 4)

Das natürliche Wirtsspektrum des Genus Pachecovirus und der vier ihm zugeordneten Spezies umfasst Vögel der Ordnung Psittaciformes und stellt ein Kriterium zur Abgrenzung von anderen Genera innerhalb der Subfamilie Alphaherpesvirinae dar. Auch durch serologische Kreuzneutralisationstests sowie mittels Spaltung des vollständigen viralen Genoms durch Restriktionsendonukleasen ist eine deutliche und einfache Unterscheidung des Genus Pachecovirus von anderen Genera möglich (SPENKOCH-PIPER, 1993; GÜNTHER, 1995; GRAVENDYCK 1996; MARSCHANG, 2000). Diese spezifischen Eigenschaften rechtfertigen die Etablierung eines neuen eigenständigen Genus.

Die vier dem Genus Pachecovirus zugeordneten Spezies Psittacid herpesvirus (PsHV-) 1 bis 4 können durch serologische Kreuzneutralisationstests anhand ihrer antigenen Eigenschaften, mittels PsHV-PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2001) sowie durch Spaltung des vollständigen viralen Genoms mit Restriktionsendonukleasen voneinander differenziert werden (vgl. Punkt 4.2, 4.3 und 4.4 sowie SPENKOCH-PIPER, 1993; TRITT, 1995; SCHRÖDER-GRAVENDYCK, 1999; TOMASZEWSKI et al., 2001, TOMASZEWSKI et al., 2003). Neu aus Vögeln der Ordnung Psittaciformes isolierte Herpesviren lassen sich mittels der genannten Methoden relativ schnell und eindeutig einer der vier Spezies zuordnen.

Die Spezies PsHV-1 mit den beiden als Mitglieder identifizierten Isolaten KS 144/79 (KALETA, 1979; im Rahmen dieser Arbeit als Referenzstamm verwendet) und dem in der ATCC unter der Nummer VR-915 hinterlegten Isolat RSL-1 (SIMPSON et al., 1975) stellt dabei die am besten charakterisierte Taxon des Genus Pachecovirus dar. Es wird daher vorgeschlagen, PsHV-1 als sog. „type species“, d. h. als Prototyp mit typischen und repräsentativen Eigenschaften für alle vier Spezies des Pachecovirus zu benennen.

6 Zusammenfassung

Die PPD ist eine seuchenhaft verlaufende Erkrankung von Vögeln der Ordnung Psittaciformes mit hoher Infektiosität und weltweiter Verbreitung. In dieser Arbeit werden 14 in den Jahren 1997 bis 2001 neu isolierte Viren aus Psittaziden aufgrund ihrer biologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften (Elektronenmikroskopische Untersuchung, Zerstörung der Infektiosität durch Chloroformbehandlung, Hemmung der Virusvermehrung in Gegenwart von IUDR, zytopathische Veränderungen in HEF-Kulturen, Neutralisation durch Antiseren gegen PsHV) als Psittaziden-Herpesviren identifiziert. Die 14 Isolate werden durch Neutralisationstests serologisch untersucht sowie durch Spaltung ihrer DNA mittels Restriktionsendonukleasen und Amplifizierung mittels PsHV-PCR nach TOMASZEWSKI et al. (2001) weitergehend in Restriktionsgruppen bzw. PCR-Varianten eingeteilt.

Jedes Isolat kann einem der 5 serologischen Subtypen nach GRAVENDYCK et al. (1996) zugeordnet werden. Das Isolat 131/01 kann dem serologischen Subtyp PsHV-1, die Isolate 564/99, 661/01, 663/01, 670/01 und 54/01 dem Subtyp PsHV-2, die Isolate 862/98, 2009/99, 2490/00 und 279/00 dem Subtyp PsHV-3 und die Isolate 3112/97, 2753/98, 180/01 und 181/01 dem Subtyp PsHV-4 o. 5 zugeordnet werden. Die Resultate der Untersuchung mittels PCR bestätigen die serologische Einteilung der 14 neuen Isolate. Auch die Ergebnisse der Restriktionsendonukleasenspaltung decken sich weitgehend mit der serologischen Einteilung und ermöglichen darüber hinaus eine weitergehende Differenzierung in Restriktionsuntergruppen. Bei den 14 neuen Isolaten werden 10 verschiedene Spaltpmuster gefunden, wobei aufgrund von Gemeinsamkeiten der Virus-DNA eine Einteilung aller 10 einzelnen Spaltpmuster in eine der von SCHRÖDER-GRAVENDYCK (1999) definierten Hauptgruppen A, B und C möglich ist.

Zusätzlich zu den 14 neuen Isolaten werden 31 sonstige, in den Jahren 1982 bis 1995 isolierte PsHV serologisch sowie mittels PsHV-PCR nach TOMASZEWSKI et al.

(2001) untersucht. Die Resultate der PCR decken sich bei 23 Isolaten mit den Ergebnissen der serologischen Untersuchung. 5 Isolate zeigen ein abweichendes Amplifizierungsmuster und werden neuen PCR-Varianten zugeordnet. Bei 8 Isolaten zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse. Die genaue Zugehörigkeit dieser Isolate sollte erneut serologisch bzw. mittels PCR oder Restriktionsenzymanalyse überprüft werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass es sich bei dem Erreger der PPD nicht um ein antigenetisch einheitliches PsHV, sondern um mindestens 4 unterschiedliche Subtypen handelt, wobei die Subtypen 1 bis 4 bzw. 5 bei den hier untersuchten Proben in annähernd gleicher Häufigkeit auftreten.

Eine Impfung gegen einen Serotyp schützt nicht ausreichend gegen andere Serotypen. Daher ist es dringend erforderlich, bei einer zukünftigen Herstellung eines Impfstoffes gegen PPD eine polyvalente Vakzine zu entwickeln, die PsHV aller 4 am häufigsten vorkommenden Subtypen enthält.

Aufgrund der gefundenen Resultate wird folgender Vorschlag zur Einordnung der PsHV in das universelle System der Virustaxonomie entworfen:

Familie Herpesviridae

Subfamilie Alphaherpesvirinae

nov. **Genus** Pachecovirus (Pacheco's Parrot Disease Like Viruses)

mit **type species**: Psittacid herpesvirus 1 (PsHV-1)

nov. **species** Psittacid herpesvirus 1 (PsHV-1; Pacheco's Parrot Disease Virus 1)

nov. **species** Psittacid herpesvirus 2 (PsHV-2; Pacheco's Parrot Disease Virus 2)

nov. **species** Psittacid herpesvirus 3 (PsHV-3; Pacheco's Parrot Disease Virus 3)

nov. **species** Psittacid herpesvirus 4 (PsHV-4; Pacheco's Parrot Disease Virus 4)

7 Summary

PPD is a disease of birds of the order *psittaciformes* with epidemic character, high infectivity and a worldwide occurrence.

In this research, 14 viruses which have been isolated from psittacids during the years from 1992 until 2002 are examined and identified as PsHV due to their biological and physico-chemical properties. The methods used for the identification are examination by electron microscopy, inhibition of the virus multiplication in the presence of IUDR, determination of the infectivity by treatment with chloroforme, analysis of the cytopathic effects in CEF-cultures and neutralization by antisera against PsHV.

Consecutively, the 14 isolates were examined serologically by cross-neutralization and then they were further divided into restriction groups or PsHV-variants by cleavage of their DNA with restriction endonucleases and by amplification with PsHV-PCR developed by TOMASZEWSKI et al. (2001).

Every isolate can be classed to one of the 5 serological subtypes according to GRAVENDYCK et al. (1996). Isolate 131/01 can be grouped to the serological subtype PsHV-1, the isolates 564/99, 661/01, 663/01, 670/01 and 54/01 to subtype PsHV-2, the isolates 862/98, 2009/99, 2490/00 and 279/00 to subtype PsHV-3 and the isolates 3112/97, 2753/98, 180/01 and 181/01 to subtype PsHV-4 or -5. The results of the PCR-assay verify the serological classification of the 14 new isolates. The results of the restriction endonuclease analysis are also largely congruent with the serological grouping and enable a further differentiation into restriction groups.

Among the 14 new isolates, 10 different cleaving patterns have been found. Due to similarities of the viral DNA, a classification of all 10 cleaving patterns into one of the main groups (A, B and C as defined by SCHROEDER-GRAVENDYCK, 1999) is possible. In addition to the 14 new isolates, 31 PsHV isolated in the years from 1982 until 1995 have been examined serologically and by PsHV-PCR according to TOMASZEWSKI et al. 2001). In the case of 23 isolates, the results of the PCR are congruent with the results of the serological examination. 5 isolates show a different

amplification pattern and are being grouped to new PCR-variants. 8 isolates show different results. The exact affiliation of these isolates should be rechecked serologically, by PCR or restriction endonuclease analysis.

The results of this work confirm that the pathogenic agent of PPD is not an antigenetically uniform PsHV, but a group of at least 4 different subtypes. Herewith the subtypes 1 through 4 respectively 5 occur in almost the same frequency in all of the different samples examined.

A vaccination against one serosubtype is not protective enough against an infection with other subtypes. Therefore it is an urgent task in the future to develop a polyvalent vaccine which contains the PsHV of all 4 subtypes that occur most often.

The results of this research give reason to make the following proposal for the classification of the PsHV into the universal system of virus taxonomy:

Family Herpesviridae

Subfamily Alphaherpesvirinae

nov. **Genus** Pachecovirus (Pacheco's Parrot Disease like Viruses)

mit **type species** Psittacid herpesvirus 1 (PsHV-1)

nov. **species** Psittacid herpesvirus 1 (PsHV-1; Pacheco's Parrot Disease Virus 1)

nov. **species** Psittacid herpesvirus 2 (PsHV-2; Pacheco's Parrot Disease Virus 2)

nov. **species** Psittacid herpesvirus 3 (PsHV-3; Pacheco's Parrot Disease Virus 3)

nov. **species** Psittacid herpesvirus 4 (PsHV-3; Pacheco's Parrot Disease Virus 4)

8 Literaturverzeichnis

ABDALA, N. (1994):

Development of an experimental ELISA for the detection of antigens and antibodies to the virus of Pacheco disease using monoclonal antibodies.
Journal of Veterinary Medicine B 41, 369-380.

AINI, I., SHIH, L.M., CASTRO, A.E. and ZEE, Y.C. (1993):

Comparison of herpesvirus isolates from falcons, pigeons and psittacines by restriction endonuclease analysis.
Journal of Wildlife Diseases 29, 196-202.

ANDREASEN, J.R., GLISSON, J.R. and VILLEGAS, P. (1990):

Differentiation of vaccine strains and Georgia field isolates of infectious laryngotracheitis virus by their restriction endonuclease fragment patterns.
Avian Diseases 34, 646-656.

ANDREWES, C. (1989):

Herpesviridae. In: Andrewes' Viruses of Vertebrates.
J.S. Porterfield 5th ed. Bailliere Tindall, London, pp. 293-299.

ANDREWES, C.H. und PEREIRA, H.G. (1964):

Viruses of Vertebrates.
J.S. Porterfield 2nd ed. Bailliere, Tindall and Cox, London, pp. 230-231.

ANDREWES, C.H. and PEREIRA, H.G. (1972):

Viruses of Vertebrates.
J.S. Porterfield 3rd ed. Bailliere Tindall, London, p 351.

ARBER, W. and LINN, S. (1969):

DNA modification and restriction.

Annual Review Biochemistry 38, 467-500.

ARENS, M.Q. and SWIERKOSZ, E.M. (1983):

Simplified method for typing herpes simplex virus by restriction endonuclease analysis.

Journal of Clinical Microbiology 17, 548-551.

ARENS, M. und WEINGARTEN, M. (1981):

Vergleichende Untersuchungen an Buffalo Green Monkey (BGM)-Zellen und Mäusen zur Isolierung von Chlamydia Psittaci aus Kot- und Organproben von Vögeln.

Zentralblatt Veterinärmedizin 28, 301-309.

ARNOLD, I.D. (1990):

An outbreak of psittacine herpesvirus in Rosellas.

Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, Pennsylvania, 1990, pp. 283-291.

BALKS, E., GRAVENDYCK, M., SCHRÖDER-GRAVENDYCK, A.S., FRANK, H., ESKENS, U., MARSCHANG, R.E & KALETA, E.F. (1998):

Untersuchungen zum Virusgehalt in Geweben und Organen von an der Pacheco'schen Papageienkrankheit gestorbenen Psittaziden.

XI. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten, München, 5.-6. März 1998,

S. 131-138.

BIGGS, P.M. (1982):

The epidemiology of avian herpesviruses in veterinary medicine.

Development of Biological Standards 52, 3-11.

BUBLOT, M., WELLEMAN, G., VAN BRESSEM, M.F., DUBUISSON, J., PASTORET, P.P. and Thiry, E (1991):

Genomic diversity among bovine herpesvirus 4 field isolates.
Archives of Virology 116, 1-18.

BUCHMAN, T.G., ROIZMAN, B. and NAHMIAS, A.J. (1979):

Demonstration of exogenous genital reinfection with herpes simplex virus type 2 by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA.
Journal of Infectious Diseases 140, 295-304.

BUCKMASTER, A.E., SCOTT, S.D., SANDERSON, M.J., BOURSNELL, M.E.G., OSS, N.L.J. and BINNS, M.M. (1988):

Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkey - implication for herpesvirus classification.
Journal of General Virology 69, 2033-2042.

CARTWRIGHT, M., SPRAKER, T.R. and McCLUGGAGE, D. (1985):

Psittacine inclusion body hepatitis in an aviary.
Journal of the American Veterinary Medical Association 187, 1045-1046.

CASTRO, A.E., WHITENACK, D.L., FENTON, L.L. and DOTSON, J.F. (1984):

Investigations of a herpesvirus isolated from a parrot with Pacheco's Parrot Disease.
27th Annual Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Stillwater, Oklahoma, 1984, pp. 87-102.

CAVILL, J.P. (1982):

Viral diseases, PPD.
In: PETRAK, M.L. (ed.): Diseases of Cage and Aviary Birds, Lea and Lebigler, Philadelphia, Pa, pp. 524-525.

CHARLTON, B.R., BARR, B.C., CASTRO, A.E., DAVIS, P.L., REYNOLDS, B.J.
(1990):

Herpes viral hepatitis in a toucan.
Avian Diseases 34, 787-790.

CHEESEMAN, M.T. and RIDDELL, C. (1995):

Esophagitis due to a herpesvirus associated with mortality in a psittacine aviary.
Avian Diseases 39, 658-660.

CHO, B.R. (1979):

In vitro cultivation and characterization of Pacheco's disease virus.
Proceedings of the 26th Western Poultry Disease Conference and
11th Poultry Health Symposium, Davis, California, pp. 24-29.

CHO, B.R. and McDONALD, T.L. (1980):

Isolation and characterization of a herpesvirus of Pacheco's parrot disease.
Avian Diseases 27, 301-303.

COOPER, R. and HOWARD, E.B. (1977):

Inclusion body disease of psittacines.
Proceedings of the 26th Western Poultry Disease Conference and
11th Poultry Health Symposium, Davis, California, pp. 24-29.

DESMIDT, M., DUCATELLE, R., UYTTEBROECK, E., WYFFELS, E., CHARLIER,
G., HOORENS, J.K. (1991):

Cytomegalovirus-like conjunctivitis in Australian finches.
Journal of the Association of Avian Veterinarians 5, 132-136.

DHARMA, D.N. and SUDANA, I.G. (1983):

Hepatic intranuclear inclusion bodies in a cockatoo bird (*Cacatua sulphurea*).
Avian Diseases 27, 301-303.

DULBECCO, R. und VOGT, M. (1954):

Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.

Journal of experimental Medicine 99, 167.

DURHAM, P.J.K., BUMBRELL, R.C. and CLARK, R.G. (1977):

Herpesvirus hepatitis resembling Pacheco's disease in New Zealand parrots.

New Zealand Veterinary Journal 25, 168-170.

EAGLE, H. (1971):

Buffer combinations for mammalian cell culture.

Science 174, 500.

EARLE, W.R. (1934):

A technique for adjustment of oxygen and carbon dioxide tensions, and hydrogen ion concentration, in tissue cultures planted in Carrel flasks.

Archiv für experimentelle Zellforschung 16, 116.

EHRSAM, H., HAUSER, B. und METZLER, A. (1978):

Pachecos Papageienkrankheit – akuter Ausbruch in einem einheimischen Psittacidenbestand.

Schweizer Archiv für Tierheilkunde 120, 23-28.

ENGELS, M., STECK, F. and WYLER, R. (1981):

Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis.

Archives of Virology 67, 169-174.

ESKENS, U., KALETA, E.F. and UNGER, G. (1994):

Eine Herpesvirus-bedingte Enzootie – Pacheco'sche Papageienkrankheit – in einem Psittacidenbestand.

Tierärztliche Praxis 22, 542-553.

FENNER, F.J., GIBBS, E.P.J., MURPHY, F.A., ROTT, R., STUDDERT, M.J. and WHITE, D.O. (1993):

Veterinary virology.

2nd ed., Academic Press Ltd., London, pp. 337-368.

FINDLAY, G.M., (1933):

Pacheco's parrot disease.

Veterinary Journal 89, 12.

FITE, R.W. (1978):

Personal Communication, 1878.

Zitiert nach: CAVILL, J.P.: (1982):

Viral diseases: Pacheco's parrot disease.

In: Diseases of cage and aviary birds, M.L. Petrak, 2nd ed.,

Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 515-527.

FOERSTER, S., CHASTEL, C., KALETA, E.F. (1989):

Crane hepatitis herpesvirus.

Journal of Veterinary Medicine B 36, 433-441.

FORTH, W., HENTSCHLER, D., RUMMEL, W. und STARKE, K. (1996):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

6. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

FUDGE, A.M. (1991):

Psittacine vaccines.

Veterinary Clinics of North America: Small animal Practice 21, 1273-1279.

GARDNER, R., WILKERSON, J., JOHNSON, J.C. (1993):

Molecular characterization of the DNA of anatid herpesvirus 1.

Intervirology 36, 99-112.

GASKIN, J.M., ROBBINS, C.M. and JACOBSON, E.R. (1979):

An explosive outbreak of Pacheco's parrot disease and preliminary experimental findings.

Annual Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, pp. 241-243.

GASKIN, J.M., ARNOLD, D.A. and ROBBINS, C.M. (1980):

An inactivated vaccine for psittacine herpesvirus infection (Pacheco's disease).

Annual Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, Seattle, 1980, pp. 102-105.

GASKIN, J.M., RAPHAEL, B., MAJOR, A., HALL, G. (1981):

Pacheco's Disease: the search for the elusive carrier bird.

Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, Seattle, 1981, pp. 24-28.

GASKIN, J.M. (1987):

Considerations in the diagnosis and control of psittacine viral infections

Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, Oahu, Hawaii, 1987, pp. 1-14.

GASKIN, J.M. (1988):

The serodiagnosis of psittacine viral infections.

Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, Oahu, Hawaii, 1988, pp. 7-10.

GASKIN, J.M. (1989):

Psittacine viral diseases: A perspective.

Journal of Zoo and Wildlife Medicine 20, 246-264.

GERLACH, H. (1984):

Virus Diseases in Pet Birds.
Small Animal Practice 14, 299-316.

GERLACH, H. (1994):

Viral diseases:
In: Ritchie, B.W., Harrison, G.J. und Harrison, L.R.(ed.), Avian medicine:
principles and application.
2nd ed. Wingers Publishing, Lake Worth, Fla, pp. 862-948.

GILARDI, K.V.K., LOWENSTINE, L.J., GILARDI, J.D., and MUNN, A. (1995):

A survey for selected viral, chlamydial and parasitic diseases in wild Dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and Tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru.
Journal of Wildlife Diseases 31, 523-528.

GILBERT, Y., CHANTAL, J., JOUGLAR, J.Y., GERHARD, H., LACHERETZ, A. and PICALET, D. (1984):

A fatal viral disease of psittacine birds resembling Pacheco's disease in the Haute-Garôme, France.
Révue de Médecine Vétérinaire 135, 303-306.

GODWIN, J.S., JACOBSON, E.R. and GASKIN, J.M. (1982):

Effects of Pacheco's parrot disease virus on haematology and blood chemistry values of Quaker parrots.
Journal of Zoo Animal Medicine 13, 127-132.

GOMEZ-VILLAMANDOS, J.G., MOZOS, E., SIERRA, M.A., FERNANDEZ, A. and DIAZ, F. (1991):

Case report: Mortality in psittacine birds in Spain.
Avian Pathology 20, 541-547.

GOODWIN, M., McGEE, E.D. (1993):

Herpes-like virus associated with a cloacal papilloma in an Orange-fronted Conure (*Aratinga canicularis*).

Journal of the Association of Avian Veterinarians 7, 23-25.

GOUGH, R.E. and ALEXANDER, D.J. (1993):

Pacheco's disease in psittacine birds in Great Britain 1987-1991.

The Veterinary Record 132, 113-115.

GRAIL, A., and HARBOUR, D.A. (1990):

Restriction endonuclease of DNA from isolates of feline herpesvirus type 1.

Japanese Journal of Veterinary Science 52, 1007-1013.

GRAHAM, D.L. (1980):

Acute avian herpesvirus infections.

In: KIRK, R.W. (ed.), Current Veterinary Therapy VII, The W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa., pp. 704-706.

GRAHAM, D.L. (1988):

Internal papillomatous disease.

Proceedings of the Association of Avian Veterinarians 31, Texas, 1988, p. 31.

GRAVENDYCK, M. (1996):

Isolierung und biologische Eigenschaften eines neuen Herpesvirus aus einem Dreifarbenblanzstar (*Lamprolornis superbus* Rüppell, 1845) sowie Versuche zur Differenzierung von Herpesviren aus Passeriformes durch Restriktionsendonukleasen.

Vet. Med. Diss., Giessen.

- GRAVENDYCK, M., TRITT, S., SPENKOCK-PIPER, H. and KALETA, E.F. (1996):
Antigenic diversity of psittacine herpesvirus: cluster analysis of antigenic differences obtained from cross-neutralization tests.
Avian Pathology 25, 345-357.
- GRAVENDYCK, M., BALKS, E., SCHRÖDER-GRAVENDYCK, A.S., ESKENS, U., FRANK, H., MARSCHANG, R.E. and KALETA, E.F. (1998):
Quantification of the herpesvirus content in various tissues and organs and associated post mortem lesions of psittacine birds which died during an epornithic of Pacheco's parrot disease (PPD).
Avian Pathology 27, 478-489.
- GÜNTHER, B.M.F. (1995):
Versuche zur Differenzierung von Herpesvirusisolaten aus verschiedenen Vogelarten durch Restriktionsendonukleasen.
Vet. Med. Diss., Giessen.
- GÜNTHER, B., KLUPP, B.G., GRAVENDYCK, M., LOHR, J.E., METTENLEITER, T.C. and KALETA E.F. (1997):
Comparison of the genomes of 15 avian herpesvirus isolates by restriction endonuclease analysis.
Avian Pathology 26, 305-316.
- GUSTAFSON, D.P., (1981):
Herpesvirus diseases of mammals and birds: Comparative aspects and diagnosis.
In: Comparative diagnosis of viral diseases. Eds: E. Kurstak and C. Kurstak, Academic Press, New York, USA, Vol III, Part A, pp. 205-263.

GUY, J.S., BARNES, H.J., MUNGER, L.L. and ROSE, L. (1989):

Restriction endonuclease analysis of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine and North Carolina field isolates.
Avian Diseases 33, 323.

GUY, J.S., BARNES, H.J. and MORGAN, L.M. (1990):

Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates.
Avian Diseases 34, 106-113.

GYLSTROFF, I. und GRIMM, F. (1987):

Infektions- und Invasionskrankheiten.
In: Vogelkrankheiten. Stuttgart, Ulmer Verlag, S. 299

HANKS, J.H. (1948):

The longevity of chick tissue cultures without removal of medium.
Journal of cellular, comparative Physiology 31, 235.

HARRISON, G.J. (1984):

Caged Bird Medicine.
In: Veterinary Clinic of North America, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa, pp. 179-199.

HEINRICHS, M.A. (1992):

Herpesvirus-induzierte Infektionen und Krankheiten bei nicht domestizierten Vogelarten – eine vergleichende Literaturstudie.
Vet. Med. Diss., Giessen.

HELFER, D.H., SCHMITZ, J.A., SEEFELDT, S.L. and LOWENSTINE, L. (1980):

A new viral respiratory infection in parakeets.
Avian Diseases 24, 781-783.

- HIRAI, K., HITCHNER, S.B. and CALNEK, B.W. (1979):
Characterization of paramyxo-, herpes- and orbiviruses from psittacine birds.
Avian Diseases 23, 148-163.
- HITCHNER, S.B. and CALNEK, B.W. (1980):
Inactivated vaccine for parrot herpesvirus infection (Pacheco's disease).
American Journal of Veterinary Research 41, 1280-1282.
- HITCHNER, S.B. and HIRAI, K. (1979):
Isolation and growth characteristics of psittacine viruses in chicken embryo.
Journal of the South African Veterinary Association 63, 59-62.
- HORZINEK, M.C. (1985):
Kompendium der allgemeinen Virologie.
2. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, S. 159.
- HOYO, J., ELLIOT, A. and SARGATAL, J. (1997):
Handbook of the Birds of the World.
Vol. 4, Lynx Edicions, Barcelona, pp 246-479.
- JOHNE, R., KONRATH, A., KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.E., KALETA, E.F.,
GERLACH, H. und MÜLLER, H. (2002):
Herpesviral, but no papovaviral sequences, are detected in cloacal papillomas of
parrots.
Archives of Virology 147, 1869-1880.
- KALETA, E.F. (1983):
Herpesvirus-induzierte Infektionen und Krankheiten des Vogels.
Tierärztliche Praxis 11, 67-75.

KALETA, E.F. (1990):

Herpesviruses of birds – a review.

Avian Pathology 19, 193-211.

KALETA, E.F. (1993):

Herpesviridae.

In: Kompendium der Geflügelkrankheiten, O. Siegmann, Hrsg., Pareys Studentexte, 5. Auflage, S. 171-180

KALETA, E.F. and BRINKMANN, M.B. (1993):

An outbreak of Pacheco's parrot disease in a psittacine bird collection and an attempt to control it by vaccination.

Avian Pathology 22, 785-789.

KALETA, E.F., HEFFELS, U., NEUMANN, U. and MIKAMI, T. (1980 a):

Serological differentiation of 14 avian herpesviruses by plaque reduction tests in cell cultures.

Proceedings of the 2nd International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Luzern, 24.-26. Juni 1980, Vol I, 38-41.

KALETA, E.F., MARSCHALL, H.-J., HEFFELS, U. und MIKAMI, T. (1980b):

Nachweis eines Herpesvirus bei Amazonen (*Amazona aestiva* und *Amazona ochrocephala*).

Zentralblatt für Veterinärmedizin (Journal of Veterinary Medicine) B 27, 405-411.

KALETA, E.F. (2003):

Infektiöse Erkrankungen. Die Pacheco'sche Papageienkrankheit.

In: KALETA, E.F. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.E.: Kompendium der Ziervogelkrankheiten, Schlütersche GmbH und Co. KG Verlag, Hannover, 2. Aufl. 2003, pp. 275-278

KALINER, G. (1975):

Intranuclear hepatic inclusion bodies in an African grey parrot.

Avian Diseases 19, 640-642.

KARESH, W.B., DEL CAMPO, A., BRASELTON, W.E., PUCHE, H., COOK, R.H.
(1997):

Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara ssp.*) in Peru.

Journal of Zoo and Wildlife Medicine 28, 368-377.

KEAM, L., YORK, C.J., SHEOARD, M., FAHEY, K.J. (1991):

Detection of infectious laryngotracheitis virus in chicken using non-radioactive DNA probe.

Avian Diseases 35, 257-262.

KEELER, L.H., BENSON, C.E., DAVISON, S. and ECKROADE, R.J. (1992):

Differences among restriction endonuclease analysis of Delmarva field isolates of infectious laryngotracheitis virus.

Avian Diseases 36, 575-581.

KIRISAWA, R., OHMORI, H., IWAI, H. and KAWAKAMI, Y. (1993):

The genomic diversity among equine herpesvirus-1 strains isolated in Japan.

Archives of Virology 129, 11-22.

KOESTERS, J., RENDEMANN, S. (1980):

Virusbedingte Hepatitiden bei Psittaciden.

Der Praktische Tierarzt 61, 134-135.

KOTIW, M., WILKS, C.R. and MAY, J.T. (1982):

Differentiation of infectious laryngotracheitis virus strains using restriction endonucleases.

Avian Diseases 26, 718-731.

KRAUSS, H. und AHRENS, M. (1981):

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Kot oder Organmaterial als diagnostischer Schnellnachweis bei der Parvovirusinfektion der Hunde.

Der praktische Tierarzt 62, 38-47.

KRAUTWALD, M.-E., FÖRSTER, S., HERBST, W., SCHILDGER, B. und KALETA, E.F. (1988a):

Nachweis eines neuen Herpesvirus bei einem ungewöhnlichen Fall von Pacheco'scher Krankheit bei Amazonen und Graupapageien.

Zentralblatt für Veterinärmedizin B 35, 415-420.

KRAUTWALD, M.-E., KALETA, E.F., FÖRSTER, S., HERBST, W., SCHILDGER, B. und SPENKOCH-PIPER, H. (1988b):

Heterogenicity of Pacheco's disease and its causative agents.

Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, 1988, pp. 11-21.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, KALETA, E.F., MARSCHANG, R.E., PIEPER, K. (2000):

Untersuchungen zur Diagnostik und Therapie der Papillomatose des aviären Gastrointestinaltraktes.

Tierärztliche Praxis 28, 272-278.

LACHMANN, P.J. (1990):

Complement genetics and host defence.

Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene 274, 316-324.

LANCZ, G.J. (1973):

Rapid method for the concentration and partial purification of herpes simplex viruses types 1 and 2.

Archiv für die gesamte Virusforschung 42, 303-306.

LEIB, D.A., BRADBURY, J.M., GASKELL, R.M., HUGHES, C.S. and JONES, R.C. (1986):

Restriction endonuclease patterns of some European and American isolates of avian infectious laryngotracheitis virus.

Avian Diseases 30, 835-837.

LIEBERMANN, H. (1992):

Herpesviridae.

In: Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie, Gustav Fischer Verlag Jena und Stuttgart, S. 226-259.

LIN, J.A., KITIGAWA, H., ONO, M., IWANAGA, R., KODAMA, H. and MIKAMI, T. (1990):

Isolation of serotype 2 Marek's disease virus from birds belonging to genus *Gallus gallus* in Japan.

Avian Diseases 34, 336-344.

LOUZIS, C., GILLET, J.P., LEDOUJET, C., MENGUY, T. et TUERY, P. (1985):

Mortalité d'étiologie complexe dans une population de psittacides: épidémiologie, clinique et recherche étiologique.

Revue de Médecine Vétérinaire 136, 639-643.

LOW, R. (1989):

Das Papageienbuch.

Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

LUDWIG, H., RUDOLPH, R., CHOWDHURY, S.I., BOSSCHE, van den, G., WINTZER, H.-J. und KRAUSER, K. (1987):

Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) Infektion beim Pferd.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 100, 147-152.

LÜTHGEN, W., FROST, W., VALDER, A. und GAUHL, C. (1980):

Eine virusbedingte Hepatopathie bei Papageien.

Praktischer Tierarzt, Collegium Veterinarium 61, 125-129.

MAGNINO, S., CONZO, G., FIORETTI, A., MENNA, L.F., RAMPIN, T., SIRONI, G.,
FABBI, M. and KALETA, E.F. (1996):

An outbreak of Pacheco's parrot disease in psittacine birds recently imported to
Campania, Italy: Isolation of psittacid herpesvirus 2.

Journal of Veterinary Medicine B 43, 631-637.

MARSCHANG, R.E. (2000):

Isolierung und Charakterisierung von Irido-, Herpes- und Reoviren aus
Landschildkröten sowie Beschreibung eines nicht charakterisierten
zytopathogenen Agens.

Vet. Med. Diss., Giessen.

MARTIN, H.T., EARLY, J.L. and BRIDGRE, J.C. (1979):

The isolation of herpesvirus from psittacine birds.

The Veterinary Record 105, 256-258.

MATTHEWS, R.E.F. (ed.) (1983):

A critical appraisal of viral taxonomy. CRC Press, Boca Raton, FL.

MAYR, A.P., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B.M. und WITTMANN, G. (1974):

Virologische Arbeitsmethoden, Band 1, Gustav-Fischer-Verlag, Jena, S. 38

Mc CLUGGAGE, D.M. (1986):

Pacheco's parrot disease in a psittacine breeding aviary.

Proceedings of the Annual Meeting of the Association of Avian Veterinarians,
Boulder, 115.

Mc DONALD, S.E. (1980):

Clinical experiences with cloacal papillomas.

Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, Houston, 1980, pp. 27-30.

MEULEMANS, G., DEKEGEL, D., PEETERS, J. and HALEN, P. (1978):

Isolation and characterization of a herpesvirus from parrots.

Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 47, 455-461.

MEYER, J.R. (1931):

Observacoes anatomo e histipathologicas feitas em orgaos de papagaos (*Amazona amazonica* e *Amazona farinosa*) mortos espontaneamente e apos inoculao de um virus que se demonstrou filtravel.

Arquivos do Instituto Biologico, Sao Paulo 4, 25-38.

MEYER, H., HÜBERT, P.H. and EICHHORN, W. (1987):

Changing in restriction enzyme pattern of the equine herpesvirus type 1 (EHV-1) strain RAC H DNA during attenuation.

Journal of Veterinary Medicine B 34, 310-313.

MILLER, T.D., MILLAR, D.L. and AQI, S.A (1979):

Isolation of Pacheco's disease herpesvirus in Texas.

Avian Diseases 23, 753-756.

MILLIGAN, G.N., BERNSTEIN, D.I. and BOURNE, N. (1998):

T-lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosa and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2.

2nd Journal of Immunology 160, 6093-6100.

MINSON, A.C., DAVISON, A., EBERLE, R., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., Mc GEOCH, D.J., PELLET, P.E., ROIZMAN, B. and STUDDERT, D.M. J. (2000):

Family Herpesviridae.

In: Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., Mc Geoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. (eds.), Virus Taxonomy. Seventh Report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

MODROW, S. (1997):

Herpesviren.

In: Modrow, S. und Falke, D. (Hrsg.), Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp.411-460..

MORGAN, R.W., CANTELLO, J., CLAESSENS, A.J. and SONDERMEYER, P. (1991):

Inhibition of Marek's disease virus DNA transfection by a sequence containing an alphaherpesvirus origin of replication and flanking transcriptional regulatory elements.

Avian Diseases 35, 70-81.

MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A. and SUMMERS, M.D. (1995):

Virus Taxonomy. 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

6th ed., Springer Verlag Wien und New York.

MUTSCHLER, E. (1991):

Chemotherapie von Viruserkrankungen.

In: Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 636-641

MUTLU, Ö.F., SCHNEEGANSS, D. und KORBEL, R. (1991):

Zum derzeitigen Vorkommen der Pacheco'schen Krankheit bei Psittaziden.

Tierärztliche Praxis 19, 64-67.

NEUBAUER, A., VON EINEM, J., EICHHORN, W., OSTERRIEDER, N. (2004):

DNA-Muster von gegenwärtig zirkulierenden Isolaten des Equinen Herpesvirus

Typ I.

Tierärztliche Umschau 59, 488-492.

NISHIMORI, T., IMADA, T., SAKURAI, M., KITABAYASHI, T., KAWAMURA, H.
and NAKAJIMA, H. (1987):

Restriction endonuclease analysis of Aujetzký's disease viruses isolated in Japan.

Japanese Journal of Veterinary Science 49, 365-367.

American Journal of Veterinary Research 52, 203-205.

NORTON, T.M., GASKIN, J., KOLLIAS, G.V., HORNER, B., CLARK, C.H. and
WILSON, R. (1991):

Efficacy of acyclovir against herpesvirus infections in Quaker parakeets.

American Journal of Veterinary Research 52, 2007-2009.

O'HARE, P (1993):

Mutually exclusive binding of two cellular factors within a critical promotor
region of the gene for the IE 110k protein of herpes simplex virus.

Journal of Virology 67, 7201-7214.

O'TOOLE, D., HAVEN, T., DRISCOLL, M. und NUNAMAKER, C. (1992):

An outbreak of Pacheco's disease in an aviary of psittacines.

Journal of Veterinary Diagnostics Investigation 4, 203-205.

- OSORIO, F.A., REED, D.E., van der MAATEN, J.M. and METZ, C.A. (1985):
Comparison of the herpesviruses of cattle by restriction endonuclease analysis and serologic analysis.
American Journal of Veterinary Research 46, 2104-2109.
- PACHECO, G. e BIER, O. (1930):
Épizootie chez les perroquets du Brasil. Relations avec psittacose.
Comptes Rendues des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales.
Paris, 105, 109-111
- PANIGRAHY, B. and GRUMBLES, L.C. (1984):
Pacheco's disease in psittacine birds.
Avian Diseases 28, 808-812
- PARROT, T. (1990):
New clinical trials using acyclovir.
Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, California, 1990, pp. 237-243.
- PASS, D.A. (1987):
Inclusion bodies and hepatopathies in psittacines.
Avian Pathology 16, 581-597.
- PAUL, P.S., MENGELING, W.L. and PIRTLE, E.C. (1982):
Differentiation of pseudorabies virus strains by restriction endonucleases.
Archives of Virology 73, 193-198.
- PEPER, U.C. (1995):
Nachweis von Paramyxo-, Herpes- und Pockenviren in Tupfer- und Organproben von Psittaziden – ein Beitrag zu Beziehungen zwischen anamnestischen sowie klinischen Daten und Virusnachweisen.

Vet. Med. Diss, Giessen.

PEPER; U.C., GEBHARDT, U.K., HERBST, W. und KALETA, E.F. (1999):

Zur Bedeutung mikrobiologischer Befunde bei klinisch unauffälligen Psittaziden und bei solchen mit klinischen Symptomen. Teil 2: Isolierte Viren.

Tierärztliche Umschau 54, 90-97.

PERSIN, M., BRATRISOVSKY, J. (1986):

Vyskyt herpesvirove hepatididy papousku – Pacheco's parrot disease – na uzemi ČSSR,

Veterinarni Medicina, Praha 31, 251-256.

PHALEN, D.N., HOMCO, L.D., GRAHAM, D.L., JAEGER, L.A. (1997):

Investigations into the etiologic agent of internal papillomatosis of parrots and ultrasonographic and serum chemical changes in amazon parrots with bile duct carcinomas.

Proceeding of the Association of Avian Veterinarians, Texas, 1997, pp. 53-56.

PIEPER, K. (1992):

Beitrag zum Nachweis der Virusausscheidung via Pharynx und Kloake bei gesunden und kranken Psittaziden unter besonderer Berücksichtigung der Herpesvirusinfektionen – Vergleich klinischer und virologischer Befunde.

Diss. Med. Vet., Giessen.

PURCHASE, H.G. (1989):

Practical application of nucleic acid techniques to avian disease problems.

Avian Diseases 33, 609-614.

RAMIS, A., FONDEVILA, D., TARRES, J., FERRER, L. (1992):

Immunocytochemical diagnosis of Pacheco's disease.

Avian Pathology 21, 523-527.

RAMIS, A., LATIMER, K.S., NIAGRO, F.D., CAMPAGNOLI, R.P., RITCHIE, B.W. and PESTI, D. (1994):

Diagnosis of psittacine beak and feather disease (PBFD) viral infection, avian polyomavirus infection, adenovirus infection and herpesvirus infection in psittacine tissues using DNA in situ hybridization.

Avian Pathology 23, 643-657.

RAMIS, A., TARRES, J., FONDEVILA, D. and FERRER, L. (1996):

Immunocytochemical study of the pathogenesis of Pacheco's Parrot disease in budgerigars.

Journal of Veterinary Microbiology 52, 49-61.

RANDALL, C.J., DAGLESS, M.D., JONES, H.G.R. and MACDONALD, J.W. (1979):

Herpesvirus infection resembling Pacheco's disease in Amazon parrots.

Avian Pathology 8, 229-238.

RINALDO, C.R. jr. and TORPEY, D.J. (1993):

Cell-mediated immunity and immunosuppression in herpes simplex virus infection.

Immunodeficiency 5, 33-90.

RITCHIE, B.W. (1995):

Avian viruses: Function and control.

Wingers Publishing, Lake Worth, Florida, USA, pp. 172-188.

RIVERS, T.M. (1931):

A recently described virus disease of parrots and parakeets differing from psittacosis.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 29, 155-156.

RIVERS, T.M. and SCHWENTKER, F.F. (1932):

A virus disease of parrots and parakeets differing from psittacosis.

Journal of Experimental Medicine 55, 911-924.

ROIZMAN, B. (1982):

The family herpesviridae: General description, taxonomy and classification.

In: The herpesviruses. Eds. B. Roizman, Plenum Press, New York and London, Vol. 1, pp. 1-23.

ROIZMAN, B. and TOGNON, M. (1983):

Restriction endonuclease pattern of herpes simplex virus DNA: Application to diagnosis and molecular epidemiology.

Current Topics in Microbiology and Immunology 104, 274-286.

ROIZMAN, B., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A.C. and STUDDERT, M.J. (1992):

The family herpesviridae: an update

Archives of Virology 123, 425-44.

ROIZMAN, B., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A.C. and STUDDERT, M.J. (1995):

Herpesviridae.

In: Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses.

Eds. Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag, Wien, New York, pp. 114-127.

ROIZMAN, B. and SEARS, A.E. (1996):

Herpes simplex viruses and their replication.

In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Lippincott-Raven Publishers, 3rd ed.
1996, Philadelphia, Pa, pp. 2231-2280.

ROSSKOPF, W.J., WOERPEL, R.W., HOWARD, E.B. and WALDER, E. (1982):

Pacheco's disease and aspergillosis in a parrot.

Modern Veterinary Practice 63, 300-301.

ROSSKOPF, W:J. (1987):

Clinical use of acyclovir

AAV Today 1, 56.

SABINE, M., ROBERTSON, G.R. and WHALLEY, J.M. (1981):

Differentiation of subtypes of equine herpesvirus by restriction endonuclease analysis.

Australian Veterinary Journal 57, p. 149.

SAMBROOK, J. and RUSSEL, D.W. (2001):

Molecular cloning. A Laboratory Manual.

3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHMIDT, U. (1992):

Infektiöse Laryngotracheitis.

In: Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Herausgeber: Heider, G., Monreal, G.,
Gustav-Fischer-Verlag, Jena, Band I, S. 419-426.

SCHRÖDER-GRAVENDYCK, A.S. (1999):

Isolierung und Charakterisierung von 10 neuen Herpesviren aus Psittaziden
sowie Versuche zur Differenzierung von insgesamt 31 Psittaziden-Herpesviren
mittels Restriktionsendonukleasen.

Vet. Med. Diss., Giessen.

SCHRÖDER-GRAVENDYCK, A.S., KALETA, E.F., MARSCHANG, R.E. and GRAVENDYCK, M. (2001):

Differentiation of psittacine herpesvirus field isolates by restriction endonuclease analysis.

Avian Pathology 30, 551-558.

SENNE, D.A., PEARSON, J.E., MILLER, L.D. and GUSTAFSON, G.A. (1983):

Virus isolation from pet birds submitted for importation into the United States.

Avian Diseases 27, 731-744.

SHEPPARD, M. (1991):

DNA fingerprint analysis of three infectious laryngotracheitis viruses.

Australian Veterinary Journal 68, 188.

SIBLEY, C.G. and MONROE jr., B.L. (1990):

Distribution and taxonomy of birds of the world.

Yale University Press, New Haven & London, p. 548.

SIKEZDI, P. (1991):

Versuche zur Differenzierung von Stämmen des Virus der Infektiösen Laryngotracheitis des Huhnes durch Restriktionsendonukleasen.

Vet. Med. Diss., Giessen.

SILVA, R.F. and BARNETT, J.C. (1991):

Restriction endonuclease analysis of Marek's disease virus DNA:

Differentiation of viral strains and determination of passage history.

Avian Diseases 35, 487-495.

SIMPSON, C.F., HANLEY, J.E. and GASKIN, J.M. (1975):

Psittacine herpesvirus infection resembling Pacheco's parrot disease.
The Journal of Infectious Diseases 131, 390-396.

SIMPSON, C.F. and HANLEY, J.E. (1977):

Pacheco's parrot disease of psittacine birds.
Avian Diseases 21, 209-219.

SIMPSON, C.F., HANLEY, J.E. and ABDALA, N. (1994):

Development of an experimental ELISA for the detection of antigens and antibodies to the virus of Pacheco disease using monoclonal antibodies.
Journal of Veterinary Medicine 41, 369-380.

SMITH, C.G. (1987):

Use of acyclovir in an outbreak of Pacheco's parrot disease.
American Association of Veterinarians Today 1, 55-56.

SMITH, H.O and NATHANS, D. (1973):

A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes.
Journal of Molecular Biology 81, 419-423.

SPENKOCH-PIPER, H. (1993):

Biologische Eigenschaften und serologische Differenzierung von 26 Psittaziden-Herpesvirus-Isolaten.
Vet. Med. Diss., Giessen.

SPENSER, E.L. (1991):

Common infectious diseases of psittacine birds seen in practice.
Veterinary Clinics of North America: Small animal practice 21, 1212-1230.

STAMP, J.T., McEWEN, A.D., WATT, J..A.A. and NISBET, D.I. (1950):

Enzootic abortion in Ewes.

The Veterinary Record 62, 251-254.

STEINKE, A. und MUNDT, S. (1997):

Ausbruch der Pacheco'schen Papageienkrankheit in einer privaten Papageienhaltung.

Der Praktische Tierarzt 78, 548-557.

STUDDERT, M.J., SIMPSON, T. and ROIZMAN, B. (1981):

Differentiation of respiratory and aborigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonuclease.

Science 214, 562-564.

STÜNZI, H. und WEISS, E. (1990):

Onkogene.

In: Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

TARRES, J., TRITT, S., ESKENS, U., FRESE, K., RAMIS, A. and KALETA, E.F. (1994):

Evaluation of antisera against three different serotypes of Pacheco's disease virus by means of immunocytochemistry (PAP) in naturally and experimentally infected birds.

IX. DVG-Tagung Vogelkrankheiten, München, 3.-4. März 1994, 178-181.

THIRY, E., VINDEVOGEL, H., LEROY, P., PASTORET, P.P., SCHWERS, A., BROCHIER, B., ANCIAUX, Y. und HOYOIS, P. (1983):

In vivo and in vitro effects of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus.

Recherches Vétérinaires Annuales 14, 239-245.

- TOMASZEWSKI, E., WILSON, VAN G., WIGLE., W.L., PHALEN, D.N. (2001):
Detection and heterogeneity of herpesviruses causing Pacheco's disease in parrots.
Journal of Clinical Microbiology 39, 533-538.
- TOMASZEWSKI, E.K., KALETA, E.F. and PHALEN, D.N. (2003):
Molecular phylogeny of the psittacid herpesviruses causing Pacheco's disease – correlation of genotype with phenotypic expression.
Journal of Virology 77, 11260-11267.
- TRAPP, A.L., LOWRIE, P.M. and ROBERTS, A.W. (1977):
Inclusion body hepatitis resembling Pacheco's parrot disease in psittacine birds in Michigan.
Proceedings of the Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians 20, 1977, 365-374.
- TRITT, S. (1995):
Untersuchungen zur Differenzierung von Psittaziden-Herpesviren mittels Kreuzneutralisationstests unter Verwendung der Clusteranalyse.
Diss. Vet. Med., Giessen.
- TSAI, S.S., PARK, J.H., HIRAI, K. and ITAKURA, C. (1993):
Herpesvirus infections in psittacine birds in Japan.
Avian Pathology 22, 141-156.
- VAN DEVANTER, D.R., WARRENER, P., BENNETT, L., SCHULTZ, E.R., COULTER, S., GARBER, R.L., ROSE, T.M. (1996):
Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR.
Journal of Clinical Microbiology 34, 1666-1671.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1990):

Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification.

Intervirology 31, 241-254.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. (2000):

Introduction to the species concept in virus taxonomy.

In: Van Regenmortel, M.V.H., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., Mc Geoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Academic Press, San Diego, 2000.

WAGNER, U. (1993):

Vergleichende Untersuchungen zur Empfindlichkeit verschiedener aviärer Herpesvirusisolate gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln.

Vet. Med. Diss., Gießen.

WEISSENBRÖCK, H. and FUCHS, A. (1995):

Histological and ultrastructural characterization of hepatic intranuclear inclusion bodies in psittacine birds and pigeons.

Avian Pathology 24, 507-521.

WILDLY, P. (1971):

Classification and nomenclature of Viruses. First Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Monographs in Virology, Volume 5, pp. 123-137.

WINNACKER, E.L. (1985):

Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie.

Nachdruck der 1. Auflage 1984, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 1-24

WINTEROLL, G. (1977):

Herpesvirusinfektionen bei Psittaziden.
Praktischer Tierarzt 58, 321-322.

WINTEROLL, G. und GYLSTORFF, I. (1979):

Schwere durch Herpesvirus verursachte Erkrankung des Respirationstraktes bei Amazonen.
Berliner und Münchner tierärztliche Wochenschrift 92, 277-280.

WOLTERS, H.E. (1982):

Die Vogelarten der Erde.
Paul Parey Verlag, Hamburg-Berlin.

WUTZLER, P. (1996):

Herpes-simplex-Virus 1 und 2.
In: Porstmann, T. (Hrsg.): Virusdiagnostik, Blackwell Wissenschafts-Verlag
Berlin und Wien, pp. 280-289.

XUAN, X., HORIMOTO, T., ONO, M., LIMCUMPAO, A., TOHYA, Y., AZETAKA, M., TAKAHASHI, E. and MIKAMI, T. (1993):

Restriction endonuclease analysis of canine herpesvirus isolated in Japan.
Japanese Journal of Veterinary Science 52, 1181-1188.

YORK, S.M. and YORK, C.J. (1983):

Pacheco virus vaccine studies.
Proceedings of the 32nd Western Poultry Disease Conference, Davis, California,
1983, pp. 101-103.

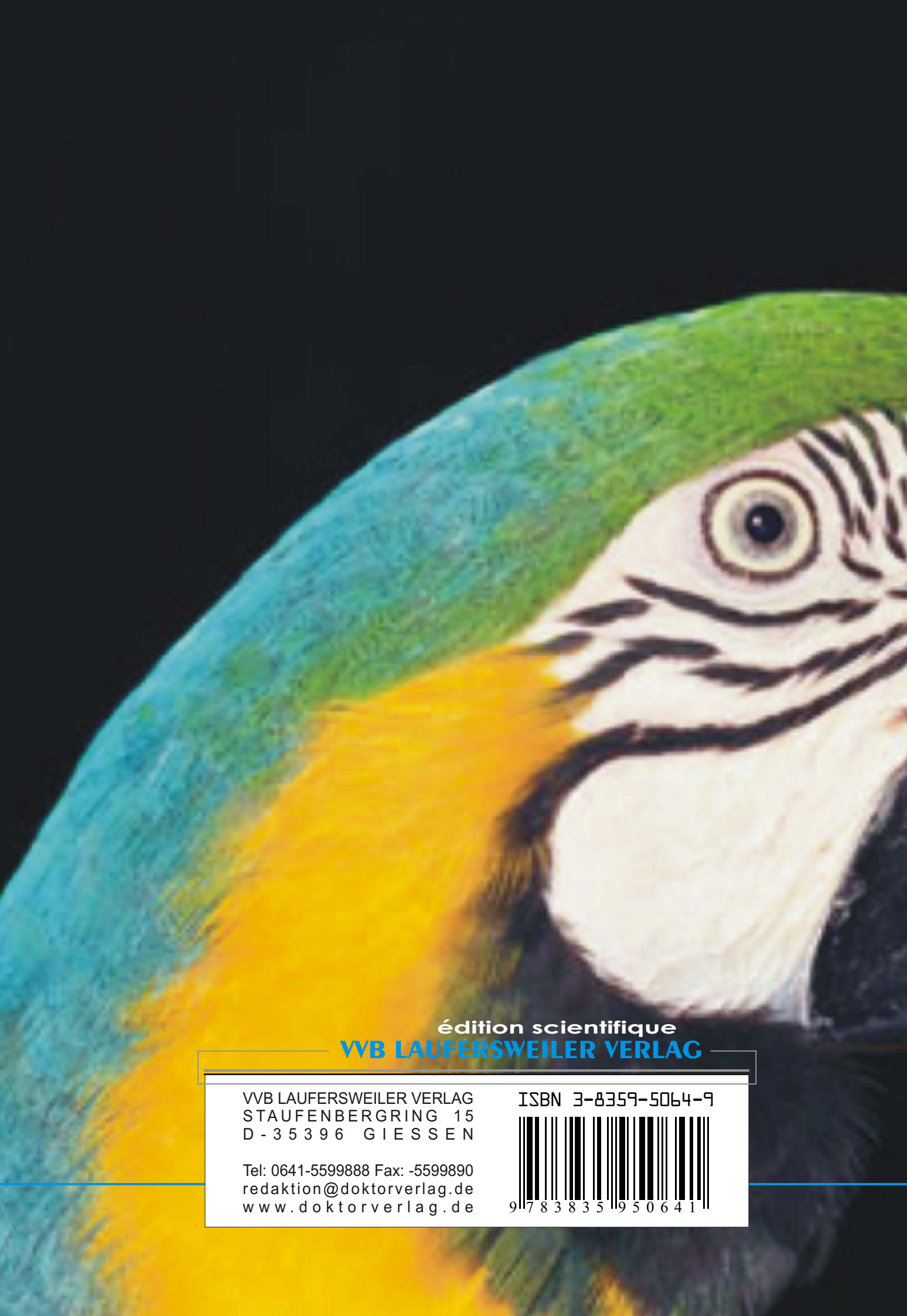
Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. E. F. Kaleta für die Vergabe des Themas und die jederzeit verständnisvolle Beratung und Betreuung bedanken. Allen im Jahre 2000 anwesenden Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die vielen anregenden Gespräche. Frau Dr. Rachel Marschang möchte ich für ihre freundliche und tatkräftige Hilfe bei der Einarbeitung in die DNA-Analyse und die konstruktive Unterstützung bei deren Durchführung danken. Den Tierpflegern danke ich für die Versorgung und Betreuung der Kaninchen über den langen Zeitraum der Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. C. Jungbäck, Abteilung Virusimpfstoffe I des Paul-Ehrlich-Instituts, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, für die Bereitstellung der dortigen Labore für den praktischen Teil dieser Arbeit und die freundliche und entgegenkommende Unterstützung nach meinem Wechsel im Jahre 2001 an das Paul-Ehrlich-Institut. Ein großes Dankeschön an meine Kolleginnen und Kollegen im Fachgebiet 4/2 des Paul-Ehrlich-Institutes Frau Dr. Brigitte Kückler und Herrn Dr. Andreas Motitschke, die mir bei allen auftauchenden praktischen und theoretischen Fragen und Problemen mit vielen nützlichen Ratschlägen und Ideen zur Seite standen. Dank auch an die Kolleginnen des Fachgebietes Frau Sandra Sattler, Frau Asta Scholten und Frau Saskia Nutolo-Merz für die praktische Unterstützung in Labor und Tierstall und die stete Hilfsbereitschaft. Bei Herrn Dr. Uwe Müller, Mitarbeiter der Abteilung Allergologie im Paul-Ehrlich-Institut, bedanke ich mich für seine Hilfe und die Anregungen beim Versuchsaufbau sowie der Analyse der Ergebnisse von SDS-PAGE und Western Blot. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die Anfertigung der Fotos und die Beratung bei deren Auswertung danke ich Herrn Dr. Klaus Boller aus der Abteilung 3.

Zuletzt möchte ich meinen herzlichsten Dank sowohl meiner Mutter Rosel Mayer für ihre jederzeit und in allen Dingen liebevolle moralische und auch finanzielle Unterstützung, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre,

als auch meinem Freund Georg Kube aussprechen, der mich immer wieder mit unerschöpflicher Geduld, Zuneigung und auch praktischer Hilfe zu jeder Uhrzeit (u.a. auch bei den vielen Computerschwierigkeiten) zur Fertigstellung des Manuskriptes aufgemuntert hat.

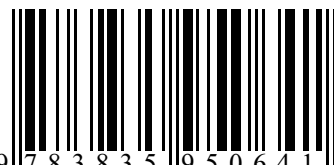


édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5064-9



9 783835 950641