

Aus der Klinik für Vögel
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leitung: Prof. Dr. Rüdiger Korb

und

dem Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Insel Riems
Leitung: PD Dr. Martin G. Beer

Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. C. H. Grund

**Einsatz eines gegen die leichte Kette von Pekingenten-
Immunglobulin gerichteten monoklonalen
Antikörpers für die Etablierung eines Newcastle
Disease-ELISA zur Überprüfung der humoralen
Impfreaktion beim Wassergeflügel**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Rafaela Häuslaigner
aus
Wasserburg am Inn

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Grund

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Erhard

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V	
1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURTEIL.....	3
2.1	Virus der Newcastle Disease.....	3
2.1.1	Taxonomische Einordnung.....	3
2.1.2	Virusaufbau.....	3
2.1.3	Eigenschaften des Virus und seiner Proteine.....	4
2.2	Newcastle Disease.....	6
2.2.1	Definition und Geschichte.....	6
2.2.2	Vorkommen.....	7
2.2.3	Pathogenese und Klinik.....	7
2.3	Newcastle Disease beim Wassergeflügel.....	9
2.3.1	Vorkommen von Antikörpern gegen aviäre Paramyxoviren des Serotyps 1 beim Wassergeflügel.....	10
2.3.2	Vorkommen von aviären Paramyxoviren des Serotyps 1 beim Wassergeflügel.....	15
2.3.3	Krankheitsverlauf und Krankheitsbild.....	19
2.3.4	Anfälligkeit des Wassergeflügels für klinische Erkrankung nach Infektion mit unterschiedlichen Pathotypen der aviären Paramyxoviren des Serotyps 1.....	20
2.3.5	Pathologische Befunde.....	22
2.3.6	Differentialdiagnosen.....	23

2.3.7	Virusausscheidung.....	27
2.3.8	Epidemiologische Rolle des Wassergeflügels.....	28
2.3.9	Impfung des Wassergeflügels gegen die Newcastle Disease.....	31
2.3.9.1	Situation in Deutschland.....	31
2.3.9.2	Impfstudien beim Wassergeflügel.....	32
2.4	Newcastle Disease - Diagnostik.....	33
2.4.1	Virusnachweis.....	33
2.4.2	Antikörpernachweis.....	35
2.5	Methoden zum Nachweis humoraler Antikörper beim Wassergeflügel... 36	
2.5.1	Hämagglutinationshemmungs-Test.....	36
2.5.1.1	Testprinzip.....	36
2.5.1.2	Testverfahren und Durchführung.....	37
2.5.1.3	Testeigenschaften.....	38
2.5.1.4	Unspezifisch reagierende Faktoren.....	39
2.5.2	Enzym-linked immunosorbent assay.....	40
2.5.2.1	Testprinzip.....	40
2.5.2.2	Testverfahren und Durchführung.....	42
2.5.2.3	Auswertung.....	47
2.5.2.4	Testeigenschaften sowie Wahl des Assaykonzepts.....	48
2.5.3	Indirekter Immunfluoreszenz-Test.....	49
2.5.3.1	Testprinzip.....	49
2.5.3.2	Testdurchführung.....	50
2.5.3.3	Testeigenschaften.....	51
2.5.4	Western Blot.....	52
2.5.4.1	Testprinzip.....	52
2.5.4.2	Testdurchführung.....	52
2.5.4.3	Testeigenschaften.....	54
2.6	Beurteilung serologischer Tests.....	55
2.6.1	Sensitivität und Spezifität.....	55

2.6.2	Richtigkeit und Wiederholbarkeit (Regressionsanalyse und Korrelation)...	57
2.6.3	Positiver und negativer Vorhersagewert.....	58
2.7	Anforderungen an serologische Tests in der heutigen Zeit.....	59
2.8	Aktuelle Situation der serologischen Diagnostik beim Wassergeflügel ...	62
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	65
3.1	Evaluation of Newcastle disease virus immunoassays for waterfowl using a monoclonal antibody specific for the duck immunoglobulin light chain	65
3.1.1	Abstract.....	65
3.1.2	Introduction.....	66
3.1.3	Materials and Methods.....	67
3.1.4	Results.....	70
3.1.5	Discussion.....	72
3.1.6	References.....	74
3.2	Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to study the specific humoral immune response of Muscovy ducks (<i>Cairina moschata</i>) and domestic geese (<i>Anser anser var. domestica</i>) after vaccination against Newcastle disease virus.....	83
3.2.1	Abstract.....	83
3.2.2	Introduction.....	84
3.2.3	Materials and Methods.....	85
3.2.4	Results.....	88
3.2.5	Discussion.....	91
3.2.6	Acknowledgements.....	94
3.2.7	References.....	94

4	ERWEITERTE DISKUSSION	103
4.1	Funktionalität des Antispezies-Antikörpers	103
4.2	Effizienz des etablierten indirekten Newcastle Disease-ELISA und seine Eignung zur Überprüfung der Antikörperantwort beim Wassergeflügel nach Impfung	106
4.3	Effizienz des inaktivierten Newcastle Disease-Impfstoffes für Hühner beim Wassergeflügel	111
4.4	Newcastle Disease beim Wassergeflügel – Impfstrategien und ihre Überwachung	114
5	ZUSAMMENFASSUNG	117
6	SUMMARY	119
7	LITERATURVERZEICHNIS	121
7.1	Gesetzestexte	121
7.2	Literatur	122
8	ANHANG	147
8.1	Tabellenverzeichnis	147
8.2	Abbildungsverzeichnis	148
	DANKSAGUNG	149

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABl.	Amtsblatt
AdenoV	Adenoviren
AGP	Agargelpräzipitationstest
AIV	Aviäres Influenzavirus
APMV	Aviäres Paramyxovirus
APMV-1	Aviäres Paramyxovirus Serotyp 1
ArboV	Arbo(arthropod born)viren
ASe	analytische (methodische) Sensitivität
ASp	analytische (methodische) Spezifität
BGBI.	Bundesgesetzblatt
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cELISA	kompetitiver Enzyme-linked immunosorbent assay
cm ³	Kubikzentimeter
d.h.	das heißt
d.i.	das ist
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSe	diagnostische Sensitivität
DSp	diagnostische Spezifität
EDSV	„egg-drop“-Syndrom-Viren (Duck Adenovirus Typ 1, DAdV-1)
EIA	Enzymimmunassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	und andere (et alteri)
etc.	und so weiter (et cetera)
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F-Protein	Fusions-Protein
g	Gramm
GP-VO	Geflügelpest-Verordnung

h	Stunde (hour)
HAH	Hämagglutinationshemmungstest
HerpesV	Herpesviren
HI test	haemagglutination inhibition test
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein
ICPI	Intracerebraler Pathogenitätsindex
i.e.	id est (das heißt)
IF-Test	Immunfluoreszenztest
Ig(s)	Immunglobulin(e)
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y (Homologon der Vögel zum IgG der Säugetiere, Davison <i>et al.</i> , 2008)
IVPI	Intravenöser Pathogenitätsindex
kDa	Kilodalton
l	Liter (litre)
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
Is	Signifikanzniveau (level of significance)
L-Protein	Large-Protein
M	molar
mAb	monoclonal antibody
mAk	monoklonaler Antikörper
MDT	Mittlere Absterberate (Mean Death Time)
MetapneumoV	Metapneumoviren
mg	Milligramm (milligramme)
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter (millilitre)
mm	Millimeter (millimetre)
mM	millimolar
min	Minute (minute)
M-Protein	Matrix-/Membran-Protein

ND	Newcastle Disease
NDV	Newcastle Disease Virus
NI-Test	Neuraminidase-Inhibitions-Test
nm	Nanometer
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
N-Test	Neutralisationstest
OD	Optische Dichte (optical density)
O.I.E.	Office International des Épizooties
<i>P</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit, P-Wert (P-value)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
ParvoV	Parvoviren
p.i.	post infectionem
PicornaV	Picornaviren
PMV	Paramyxovirus
POD	Peroxid
P-Protein	Phospho-Protein
p.v.	post vaccinationem
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
rDSe	relative diagnostische Sensitivität
rDSp	relative diagnostische Spezifität
ReoV	Reoviren
RNA	Ribonukleinsäure
sec	Sekunde (second)
s/p-Ratio	sample to positive control ratio
vNDV	velogenes Newcastle Disease Virus
v/v	volume per volume
WB	Western Blot
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter (microlitre)

1 EINLEITUNG

Die durch aviäre Paramyxoviren des Serotyps 1 (APMV-1) verursachte Newcastle Disease (ND) ist eine der weltweit bedeutendsten Erkrankungen des Wirtschaftsgeflügels. Aufgrund von Tierverlusten, Handelsbeschränkungen und Bekämpfungsmaßnahmen sind Ausbrüche in der Regel mit extremen wirtschaftlichen Einbußen verbunden. Die Tierseuche wird deshalb in der Liste des O.I.E. geführt und unterliegt in Deutschland laut der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (BGBl. I 2008 S. 2315) der Anzeigepflicht.

Neben Hühnern, Puten und Tauben ist auch das Wassergeflügel, insbesondere Enten und Gänse, für Infektionen mit aviären Paramyxoviren dieses Serotyps empfänglich. Aufgrund zahlreicher virologischer und serologischer Nachweise wird wildlebendes Wassergeflügel als potentiell APMV-1-Reservoir angesehen (Werner, 1988; Alexander *et al.*, 1992; Takakuwa *et al.*, 1998; Hlinak *et al.*, 1998). Während es bei Hühnervögeln in Abhängigkeit von den APMV-1-Pathotypen zu verheerenden Ausbrüchen mit hoher Morbidität und Mortalität kommt, gelten Enten und Gänse als verhältnismäßig resistent gegenüber den meisten für Hühner pathogenen Stämmen. Fälle von klinischer Erkrankung sind äußerst selten (Alexander & Senne, 2008). Eine Ausnahme hiervon bilden die, seit Ende der 90er Jahre bei domestizierten Gänsen sowie Hühnern in China auftretenden, durch gänsepathogene APMV-1-Stämme verursachten verlustreichen ND-Ausbrüche (Wan *et al.*, 2004).

Unabhängig von der klinischen Ausprägung kommt es nach einer APMV-1-Infektion jedoch zur Replikation und Ausscheidung des Virus. Damit können speziell Enten und Gänse unerkannte APMV-1-Träger sein und zur Verbreitung des Erregers beitragen. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, das Wassergeflügel in epidemiologische Untersuchungen und Impfprogramme einzubeziehen. Dazu erforderliche Überwachungsprogramme bzw. Vakzinationskontrollen setzen das Vorhandensein adäquater Nachweisverfahren voraus. Die Serologie kann hier, vor allem aufgrund ihres gegenüber dem direkten Virusnachweis breiteren diagnostischen Fensters, wertvolle Dienste leisten. Im Vergleich zu der Situation bei Hühnern und Puten ist die Auswahl an serologischen Testmethoden beim Wassergeflügel jedoch limitiert. Das Testsystem der Wahl ist bei diesen Vogelspezies derzeit immer noch der für große Probenaufkommen ungeeignete und insbesondere beim Wassergeflügel mit unspezifischen Reaktionen behaftete HAH. Enzymverstärkte Testsysteme weisen in dieser Beziehung deutliche Vorzüge auf. Mit der Entwicklung eines monoklonalen, gegen die leichte

Kette von Pekingenten-Immunglobulin (Ig) gerichteten Antispezies-Antikörpers (Kothlow *et al.*, 2005) stand nun ein geeignetes Reagenz für die Etablierung derartiger Testverfahren beim Wassergeflügel zur Verfügung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe dieses Antispezies-Antikörpers einen indirekten ND-ELISA für die Serodiagnostik beim Wassergeflügel zu entwickeln. Die vorab zu klärende Frage war, ob der Antikörper auch Immunglobuline (Igs) anderer Wassergeflügelspezies, wie Moschusenten und Hausgänsen erkennt und ob die mit ihm entwickelten Testsysteme für den Nachweis von Immunreaktionen beim Wassergeflügel geeignet sind. In einem ersten Schritt sollte deshalb seine Kreuzreaktivität mit Igs diverser Wassergeflügelspezies und seine Funktionsfähigkeit innerhalb der Antikörperkaskade verschiedener enzymverstärkter Testverfahren analysiert werden. Die Effizienz des etablierten indirekten ND-ELISA sollte anschließend im Vergleich zum HAH anhand einer größeren Anzahl von Seren aus einer Vakzinationsstudie domestizierter Hausgänse (*Anser anser var. domestica*) und Moschusenten (*Cairina moschata*) untersucht werden.

Der etablierte ELISA soll die Überwachung der humoralen Immunantwort beim Wassergeflügel nach Impfung erleichtern und kann darüber hinaus wertvolle Dienste für das Studium der Immunantwort in diesen Vogelspezies leisten.

2 LITERATURTEIL

2.1 Virus der Newcastle Disease

2.1.1 Taxonomische Einordnung

Das Virus der Newcastle Disease (Newcastle disease virus, NDV), auch aviäres Paramyxovirus Serotyp 1 (APMV-1) genannt, wird innerhalb der Ordnung Mononegavirales, zusammen mit acht weiteren aviären Serotypen (APMV-2 bis APMV-9), dem Genus Avulavirus der Familie Paramyxoviridae zugeordnet. Der Grund für ihre Abgrenzung in ein eigenes Genus ist die hohe Sequenzhomologie der APMV untereinander bzw. ihre Divergenz von den anderen Vertretern der Virusfamilie. Innerhalb der Subfamilie Paramyxovirinae zeigen sie die höchste Verwandtschaft zum Genus Rubulavirus (Lamb *et al.*, 2005). Phylogenetische Analysen der Genomgrößen sowie der Gensequenz des Fusions- und des Large-Proteins führten zur Einteilung der APMV-1 in zwei Claden, Klasse I und Klasse II (Czeglédi *et al.*, 2006). Während erstere, abgesehen von wenigen Ausnahmen, größtenteils aus Wassergeflügel (Ordnung *Anatidae*) sowie aus Geflügel US-amerikanischer Geflügelmärkte isolierte avirulente Stämme umfasst, werden in die Klasse II sowohl avirulente als auch virulente Isolate von Hühnervögeln, Ziervögeln sowie Wildvögeln eingruppiert (Kim *et al.*, 2007). Beide Klassen sind, basierend auf räumlich-zeitlichen sowie wirtsspeziesabhängigen Unterschieden, in sich wieder in sogenannte Genotypen sowie Subgenotypen unterteilt. Die Anzahl der Genotypen und Subgenotypen ändert sich ständig aufgrund neu entdeckter und sequenzierter APMV-1-Stämme. Klasse II umfasst derzeit mindestens neun Genotypen (I – IX) (Kim *et al.*, 2007).

2.1.2 Virusaufbau

Das APMV-1 ist ein behülltes RNA-Virus von meist sphärischer Gestalt, wobei neben mehr oder weniger runden Partikeln mit einem Durchmesser von 150 bis 350 nm auch Viren von pleomorpher, z.T. filamentöser Form und unterschiedlicher Länge beobachtet werden können (Lamb & Kolakofsky, 2001). Morphologisch kann das Virion in zwei Untereinheiten,

die Virusmembran und das Nukleokapsid unterteilt werden. Die zweilagige, lipidhaltige Membran ist zellulärer Abstammung und wird vom Virus bei der Knospung an der Zellmembran erworben. Ihr auffallendstes Merkmal sind 8 bis 12 nm lange spikeartige Projektionen. Es handelt sich dabei um die glykosylierten Makromoleküle Hämagglutinin-Neuraminidase(HN)- und Fusions(F)-Protein. Mit der Innenseite der Membran ist ein weiteres Protein, das Membran- oder Matrix(M)-Protein assoziiert. Das im Innern des Virions eingeschlossene helikale Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 17 bis 18 nm wird durch das Nukleokapsid(N)-Protein und das Virusgenom, eine einzelsträngige nicht segmentierte lineare RNA negativer Polarität gebildet. Mit dieser Kernstruktur sind außerdem das Large(L)- und das Phospho(P)-Protein assoziiert (Lamb & Kolakofsky, 2001).

2.1.3 Eigenschaften des Virus und seiner Proteine

Die relative molare Masse der Paramyxoviren (PMV) beträgt 500×10^6 und ihre relative Schwebedichte in Sucrose 1.18-1.20 g/cm³ (Alexander & Senne, 2008). Das APMV-1-Genom besitzt eine Größe von ca. 15 000 Nukleotiden und kodiert für die sechs Strukturproteine (N, P, M, F, HN und L), sowie für mehrere Nichtstrukturproteine (Lamb *et al.*, 2005).

Die nukleokapsid-assoziierten Proteine (L, P und N) sind in die Stabilisierung des Virusgenoms und die RNA-Synthese involviert, wobei die RNA-Polymerasefunktion dem L-Protein zuzuschreiben ist. Das membranassoziierte M-Protein spielt neben seiner strukturgebenden, die Membran stabilisierenden Funktion vermutlich auch eine Rolle bei der Virusreifung. Unter den Membranproteinen ermöglicht das HN-Protein zum einen die Adsorption des Virions an neuraminsäurehaltige Rezeptoren empfänglicher Zellen und verhindert zum anderen über seine Neuraminidase-Funktion wahrscheinlich eine Wiederanlagerung an Zellrezeptoren nach der Knospung. Aufgrund der Fähigkeit des HN-Glykoproteins an die oben genannten Rezeptoren zu binden, bewirken Paramyxoviren, vergleichbar den Orthomyxoviren (Hirst *et al.*, 1941), eine Agglutination roter Blutkörperchen verschiedener Tierarten (Lancaster, 1966; Alexander & Senne, 2008). Diese Eigenschaft wird im Hämagglutinations- und im Hämagglutinationshemmungstest (Burnet, 1942) diagnostisch genutzt (s. Abschnitt 2.5.1).

Das F-Protein vermittelt nach der Adsorption die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. Voraussetzung für die Funktion des F-Proteins ist eine vorhergehende Spaltung des Vorläufer-Proteins (F_0) durch wirtseigene Proteasen in seine aktive Form. Die Virulenz der APMV-1 ist direkt korreliert mit der Aminosäure-Zusammensetzung ihrer F_0 -Spaltstelle (Rott & Klenk, 1988; Alexander & Senne, 2008; de Leeuw *et al.*, 2003). Virulente Stämme zeichnen sich in diesem Bereich durch ein dibasisches Aminosäuremotiv am Carboxyl-Terminus des F_2 -Gens und Phenylalanin am Amino-Terminus des F_1 -Proteins (Position 117) aus. Ihr F_0 -Protein kann somit durch ein breites Spektrum an wirtseigenen Proteasen gespalten werden, weshalb in zahlreichen Geweben infektiöse Virionen produziert werden und zu einer systemischen Infektion führen können. Avirulente APMV-1 besitzen dagegen ein monobasisches Aminosäuremuster im Spaltstellenbereich, mit Arginin an Position 117, wodurch sie auf spezielle, nicht ubiquitär vorkommende trypsin-ähnliche Proteasen angewiesen sind und nur lokale, in der Regel den Respirations- oder Intestinaltrakt betreffende Infektionen hervorrufen können.

Nach Fusion der Viruspartikel mit der Zellmembran und Entlassung des Nukleokapsids in die Zelle kommt es zur Replikation der Viren im Zytoplasma. Trotz des zytoplasmatischen Replikationszyklus können in infizierten Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* intranukleäre Einschlusskörperchen auftreten (Granzow *et al.*, 1999).

Gegen alle viralen Proteine werden im Laufe einer Infektion Antikörper gebildet (Lamb *et al.*, 2005), wobei HN- und F-Proteine durch die Induzierung neutralisierender Antikörper vermutlich die Hauptimmunogene der APMV-1 im Sinne eines Schutzes darstellen (Kaleta, 1992).

Die Tenazität der APMV-1 ist, wie bei behüllten Viren zu erwarten, relativ gering. Sowohl gegenüber physikalischen als auch chemischen Einflüssen sind sie relativ empfindlich. Eine Erwärmung auf 56 °C führt je nach Stamm innerhalb von 15 bis 60 Minuten zu einem Verlust der Infektiosität (Wachendörfer, 1965; Lomniczi, 1975). Unter den chemischen Mitteln sind Lipidlösungsmittel, ionische und anionische Tenside, Formaldehyd und oxidierende Agentien wirksam. Dennoch besteht in Abhängigkeit von dem umgebenden Material und der Umgebungstemperatur eine gewisse Stabilität in der Außenwelt, die neben der direkten auch eine indirekte Übertragung über kontaminiertes Material (Boden, Wasser, Luft, Futter, Mist, Stallutensilien) sowie Menschen und Tiere (Vögel, Nager, Avertebraten) ermöglicht. In feuchter Erde sowie nach schneller Trocknung ist die Überlebensdauer erhöht (Boyd &

Hanson, 1958). Aus experimentell kontaminiertem Seewasser war eine Reisolierung des Virus 11 bis 19 Tage lang möglich (Boyd & Hanson, 1958). In Fäzes hält sich APMV-1 bei winterlichen Temperaturen für mehrere Wochen (Frölich *et al.*, 1992).

2.2 Newcastle Disease

2.2.1 Definition und Geschichte

Die Newcastle Disease (ND) ist eine, durch virulente aviäre Paramyxoviren des Serotyps-1 hervorgerufene Erkrankung von in der Regel hochkontagiösem Charakter und mit nahezu weltweiter Verbreitung. Sie unterliegt aufgrund der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (BGBl. I 2008 S. 2315) der Anzeigepflicht. Die zahlreichen Synonyme (Atypische oder Asiatische Geflügelpest, Koreanische Hühnerseuche, Pseudovogelpest, Ranikhet disease, Tetelo disease, aviäre Pneumoenzephalitis und Doylesche Krankheit) verdeutlichen den verheerenden Charakter der Erkrankung. Die wirtschaftliche Bedeutung von Ausbrüchen erklärt sich nicht nur aus den direkten Tierverlusten und Gewinneinbußen, sondern auch aus den resultierenden Handelsrestriktionen und hohen Kosten für Bekämpfungs- und Prophylaxemaßnahmen (Leslie, 2000).

Nach der allgemeinen Auffassung traten, durch APMV-1 verursachte schwere Ausbrüche erstmals 1926 auf Java (Indonesien) und in Newcastle-on-Tyne (England) auf (Doyle, 1927; Alexander & Senne, 2008). Es ist allerdings zu vermuten, dass es sich bei einigen Ausbrüchen hochpathogener Erkrankungen bei Geflügel in Europa und Asien, Mitte und Ende des 19. sowie Anfang des 20. Jahrhunderts, aufgrund von ND-ähnlichen Charakteristika bereits um APMV-1-Infektionen gehandelt haben muss (Jacotot, 1950; Lancaster, 1966; Alexander & Senne, 2008). So wurden zum Beispiel bei einem mit hohen Verlusten einhergehenden Ausbruchsgeschehen auf den Western Isles of Scotland 1898 neben respiratorischen auch, für bestimmte Formen der ND typische, neurologische Störungen beobachtet (Macpherson, 1956). Von 1926 bis heute kam es wahrscheinlich zu insgesamt vier Panzootien mit hochpathogenen APMV-1 (Alexander, 2001). Während der erste, vermutlich von Asien ausgehende Seuchenzug aufgrund des durch den Zweiten Weltkrieg gestörten Handels annähernd 30 Jahre brauchte, um eine echte Pandemie zu werden, breitete sich die zweite

Pandemie (Ende der 1960er Jahre) innerhalb von vier Jahren wahrscheinlich von Nahost über die ganze Welt aus. Antigenetische und genetische Untersuchungen von Alexander und Mitautoren (1997) sowie Lomniczi und Mitautoren (1998) geben Hinweise für eine dritte Pandemie in den späten 1970er Jahren, wobei der in dieser Zeit bereits weit verbreitete Einsatz von Lebendimpfstoffen eine genaue Bestimmung von Ausbreitungsbeginn und -weg unmöglich macht. Von der vierten Pandemie in den 1980er Jahren waren vor allem Reise- und Schautauben betroffen, mit wenigen Übertragungen auf das Wirtschaftsgeflügel. Das antigenetisch von den bisherigen NDV abweichende Virus wurde in der Folge Tauben-Paramyxovirus Typ 1 (pigeon paramyxovirus, PPMV-1) genannt (Alexander *et al.*, 1985). Zur Erklärung der seit Beginn des 20. Jahrhunderts auftretenden Seuchenzüge wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt (Alexander, 2001; Alexander & Senne, 2008). Insbesondere nach den Ausbrüchen in Irland und Australien hat die Hypothese einer Entstehung virulenter APMV-1 durch Mutation aus weniger virulenten Stämmen an Wahrscheinlichkeit gewonnen (s. Abschnitt 2.3.8).

2.2.2 Vorkommen

Außer den vornehmlich von seuchenhaften Ausbrüchen betroffenen Hühnervögeln ist eine Reihe weiterer Vogelarten zahlreicher, wenn nicht aller Familien und Ordnungen für eine Infektion mit NDV empfänglich (Kaleta & Baldauf, 1988). In großen Teilen Afrikas, Asiens und Zentralamerikas sowie Teilen Südamerikas muss von einem enzootischen Vorkommen oder zumindest regelmäßig auftretenden Epizootien ausgegangen werden. In höher entwickelten Ländern wie Westeuropa kommt es trotz gesetzlich festgelegter Bekämpfungsmaßnahmen in ziemlich regelmäßigen Abständen zu sporadischen Epizootien (Alexander & Senne, 2008).

2.2.3 Pathogenese und Klinik

Die Vögel infizieren sich durch Inhalation oder orale Aufnahme des in großen Mengen über den Respirations- und Intestinaltrakt ausgeschiedenen infektiösen Virus (Alexander, 1988a). Eine Übertragung kann direkt von Vogel zu Vogel oder indirekt über die kontaminierte

Umgebung (Luft, Futter, Wasser, Gegenstände), Geflügelprodukte, kontaminierte Impfstoffe, andere Tiere sowie den Menschen erfolgen (Lancaster, 1966; Alexander, 1988a). Eine vertikale, transovarische Übertragung mit Entwicklung schlupffähiger Embryonen wird kontrovers diskutiert. French und Mitautoren (1967) berichten über den Schlupf infizierter Küken nach experimenteller *in ovo* Infektion mit lentogenem NDV. Williams und Dillard (1968) konnten zeigen, dass eine Penetration des Virus nicht nur über die beschädigte, sondern auch über die intakte Eischale möglich ist. Vertikale Übertragungen von ND-Impfvirus auf das Brutei wurden beobachtet (Lancaster & Alexander, 1975). Unabhängig vom Infektionsweg repliziert das Virus zunächst lokal im Bereich der Eintrittspforte, um sich dann je nach Virulenz hämatogen auszubreiten und an Sekundärlokalisationen wie Lunge, Milz, großen Parenchymen, Darm- und Lungenepithel zu vermehren (Kaleta, 1992). Die Inkubationszeit beträgt zwei bis 15 (meist fünf bis sechs) Tage. Wie das klinische Krankheitsbild ist sie zum einen abhängig von der Virulenz des Virusstammes, der Dosis und dem Infektionsweg, zum anderen von der Wirtsspezies, ihrem Alter und Immunstatus. Daneben wird sie beeinflusst durch Begleitinfektionen und Umweltbedingungen, wie sozialem oder witterungsbedingtem Stress (McFerran & McCracken, 1988). Die Virusausscheidung mit Sekreten und Darminhalt beginnt noch während der Inkubationszeit, meist am 3. Tag *post infectionem* (p.i.), und erreicht je nach Infektionsweg ihr Maximum am 5. bzw. 6. Tag p.i. (Kohn, 1955).

Je nach ihrer Pathogenität für Hühner wird zwischen viscerotrop bzw. neurotrop velogenen (hochvirulenten), mesogenen (mäßig virulenten), lentogenen (wenig virulenten) und avirulenten APMV-1 (Alexander & Senne, 2008) und in der Folge zwischen den entsprechenden Krankheitsverläufen variabler Schwere unterschieden. So treffen die folgenden Ausführungen vornehmlich auf Hühner zu, während bei anderen Vogelspezies, was die Ausprägung des Krankheitsbildes betrifft, größere Variationen möglich sind. Infektionen mit velogenem AMPV-1 sind bei allen Altersgruppen gekennzeichnet durch einen plötzlichen Beginn mit perakuten Todesfällen (Mortalität bis 100%) bzw. durch anfängliche Apathie, Inappetenz, hochgradige Atembeschwerden und Schwäche, die innerhalb von 24 Stunden in völliger Erschöpfung und Tod endet. Typisch ist eine rasche Ausbreitung in der Herde. Es können Ödeme im Kopfbereich, grünlicher Durchfall sowie Muskelzittern, schlaffe Lähmungen der Gliedmaßen, Tortikollis und Opisthotonus auftreten.

Daneben kommt eine mehr neurotrope velogene Verlaufsform vor, mit ebenfalls plötzlichem Beginn und schweren respiratorischen Störungen, auf die innerhalb von ein bis zwei Tagen neurologische Ausfallserscheinungen und ein drastischer Rückgang der Legetätigkeit folgen. Die Mortalität ist bei dieser Variante deutlich geringer, schwankt jedoch je nach Alter zwischen unter 50 und 90%. Bei mesogenen Verlaufsformen dominieren die respiratorischen Symptome und es kommt zu einem deutlichen, mehrere Wochen anhaltenden Abfall der Eiproduktion. Neurologische Symptome sind selten, die Mortalität liegt altersabhängig zwischen 5 und 50%. Lentogene APMV-1 führen bei adulten Tieren in der Regel nicht zu klinischen Symptomen. Bei Jungvögeln können sie jedoch, insbesondere einhergehend mit Koinfektionen, mehr oder weniger schwere respiratorische Erkrankungen hervorrufen (Kaleta, 1992; Alexander & Senne, 2008)

2.3 Newcastle Disease beim Wassergeflügel

Als Wassergeflügel werden in der vorliegenden Studie die zoologisch der Familie *Anatidae*, Ordnung *Anatiformes*, zugehörigen Gänse, Enten und Schwäne zusammengefasst. Neben zahlreichen anderen wilden und domestizierten Vogelarten ist auch das Wassergeflügel empfänglich für Infektionen mit APMV-1. Nach allgemeiner Auffassung gilt es allerdings tendenziell als relativ resistent gegenüber der klinischen Ausprägung der ND (s. Abschnitt 2.3.3). Vögel mit ständigem Kontakt zu Süß- oder Salzwasser, worin APMV-1 verhältnismäßig lange überleben können, scheinen generell resistenter gegenüber virulenteren Pathotypen der APMV-1 zu sein. Der bei den meisten Wassergeflügelarten, vor allem zu Mauser- und Vogelzugzeiten gegebene, enge inner- und zwischenartliche Kontakt ermöglicht zudem eine rege Weitergabe bzw. einen gegenseitigen Austausch von Viren mit anschließender Immunreaktion und ist eine ideale Voraussetzung für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Persistenz von APMV-1 in Wassergeflügelpopulationen (Kaleta & Baldauf, 1988).

2.3.1. Vorkommen von Antikörpern gegen aviäre Paramyxoviren des Serotyps 1 beim Wassergeflügel

Ergebnisse serologischer Untersuchungen aus verschiedenen Teilen der Erde sprechen für ein, im Vergleich zu anderen Wildvögeln relativ häufiges Vorkommen natürlicher APMV-1-Infektionen bei gesund erscheinenden freilebenden Enten, Gänsen und Schwänen. Die in diversen Studien festgestellte Nachweishäufigkeit APMV-1-spezifischer Antikörper variiert stark, liegt aber meist unter 50% (Tabelle 1). Bei der Interpretation von Untersuchungsergebnissen sind zahlreiche Einflussfaktoren zu beachten. So scheint die Vorkommenshäufigkeit von APMV-spezifischen Antikörpern saisonalen und geographischen sowie durch Vogelart und -alter bedingten Schwankungen zu unterliegen.

Was den Einfluss des Geschlechts und des Alters auf die Antikörper-Prävalenz betrifft, gehen die Meinungen auseinander. Friend und Trainer (1970) berichten bei in Gefangenschaft gehaltenen weiblichen Stockenten über fast doppelt so viele Antikörper-Nachweise gegen APMV-1 wie bei männlichen Tieren. Ähnliche Feststellungen machten Bradshaw und Trainer (1966) bei wilden Stockenten und Gänsen, führten aber als mögliche Ursache neben ökologischen Faktoren in der Population auch die Zahl der beprobten Tiere an. Palmer und Trainer (1970) sehen infolge ihrer serologischen Untersuchungen bei Kanadagänsen, im Zentrum und Osten der USA, zwar einen Zusammenhang zwischen der Nachweishäufigkeit APMV-1-spezifischer Antikörper und dem Alter der Tiere, nicht aber zwischen ersterer und dem Geschlecht oder der sexuellen Aktivität bzw. dem Zugverhalten. Wie Stanislawek und Mitautoren (2002) fanden sie weniger positive Reagenten bei flugunfähigen Jungtieren. Stanislawek und Mitautoren (2002) erklärten dies mit den bei älteren Tieren höheren Infektionsmöglichkeiten. Vickers und Hanson (1982a) konnten dagegen bei wilden Stockenten weder zwischen den Geschlechtern noch zwischen den Altersklassen einen signifikanten Unterschied im Vorkommen APMV-1-spezifischer Antikörper feststellen.

Saisonale Schwankungen in der Nachweishäufigkeit von Antikörpern gegen APMV scheinen stark mit dem Lebenszyklus der Vögel zu korrelieren (Maldonado *et al.*, 1994, 1995). Demnach ist in Regionen mit saisonal hoher Vogeldichte auch mit einer höheren Antikörper-Prävalenz zu rechnen. Dasselbe gilt für Gebiete mit kürzlichen ND-Ausbrüchen bzw. routinemäßiger Impfung von Wirtschaftsgeflügel mit APMV-1-Lebendvakzinen (Pearson & McCann, 1975; Wobeser *et al.*, 1993; European Food Safety Authority, 2007).

Auch bei im Freien gehaltenem domestiziertem Wassergeflügel werden Antikörper gegen APMV-1 regelmäßig nachgewiesen (Friend & Trainer, 1970; Spalatin & Hanson, 1975; Jacobi, 1982; Hlinak *et al.*, 1992a).

Wie lange nach einer natürlichen Infektion detektierbare Antikörper vorhanden sind, ist unklar. Asplin (1947) verzeichnet bei experimentell infizierten Enten und Gänsen ab dem 6. bis 7. Tag p.i. im HAH messbare Antikörpertiter. Friend und Trainer (1972) konnten bei, mit Stamm Texas-GB infizierten Stockenten über einen Untersuchungszeitraum von 40 Tagen Antikörper nachweisen. Die höchsten Titer ($\log_2 8,32 - \log_2 9,32$) detektierten sie an Tag 7 bzw. 8 p.i.. Spalatin und Hanson (1975) wiesen bei, mit den velogenen Stämmen Texas-GB und Trinidad infizierten Gänsen über den gesamten Untersuchungszeitraum von 148 Tagen Antikörper nach. In Untersuchungen von Vickers und Hanson (1982a) zeigten die Antikörpertiter von experimentell mit einem aus Wildenten isolierten APMV-1 infizierten Stockenten 15 Tage p.i. einen Peak, fielen dann bis zur 4. bzw. 6. Woche nach der Infektion stark ab und blieben für den Rest des 19-wöchigen Untersuchungszeitraumes auf sehr niedrigem Niveau. Nur bei zwei weiblichen Enten kam es mit dem Beginn der Legeperiode, in der 10. Woche p.i., zu einem erneuten steilen Antikörperanstieg bis zur 14. Woche und danach zu einem vergleichbar starken Abfall.

Tabelle 1. In serologischen Studien ermittelte Antikörper-Vorkommen gegen APMV-1 beim Wassergeflügel

Ort	Zeitraum	Spezies	NW ¹ (%)	Test	Studie
Argentinien (Buenos Aires Province)	1998-2000	Enten	kA ² (40.0)	HAH	Zanetti et al. , 2005
		Gänse	kA (42.0)		
		Schwäne	kA (35.0)		
Australien (Gippsland, Victoria)	1972	Weißkehlenen (<i>Anas gibberifrons</i>)	14/85 (16.5) 8/83 (9.6)	HAH	Hore et al. , 1973
Deutschland (Brandenburg, Mecklenburg-VP, Sachsen)	1983-1989	Pekingenten (dom.)	88/2784 (3.2)	HAH	Hlinak et al. , 1992a
	1990-1991	Moschusenten (dom.) (<i>Cairina moschata</i>)	162/4390 (3.7)		
		Hausgänse (<i>Anser anser</i> var. dom.)	13/266 (4.9)		
		Pekingenten (dom.)	31/310 (10.0)		
Deutschland	kA	Moschusenten (dom.) (<i>Cairina moschata</i>)	77/310 (24.8)	EIA	Ziedler & Hlinak, 1993
		Stockenten (<i>Anas platyrhynchos</i>)	21/660 (3.1)	HAH	
		Moorenten (<i>Aythya nyroca</i>)	134/660 (20.3)	EIA	
		Krickenten (<i>Anas crecca</i>)	5/155	HAH	
		Schellenten (<i>Bucephala clangula</i>) Höckerschwäne (<i>Cygnus olor</i>)	1/7 2/3 2/4 7/27		
Deutschland (Havelland, Gülper-See)	1991 Okt.	Blässgänse (<i>Anser albifrons</i>)	26/65 (40.0)	ELISA	Hlinak et al. , 1998
		Saatgänse (<i>Anser fabalis</i>)	32/65 (49.2)		
Finnland	2006 Aug.-Okt.	diverses Wassergeflügel (<i>Anseriformes</i>)	2/310 (0.6)	HAH	Lindh et al. , 2008
Neuseeland	1997 Jan.-März	Stockenten (<i>Anas platyrhynchos</i>)	293/315 (93.0)	HAH	Stanislawek et al. , 2002

Ort	Zeitraum	Spezies	NW (%)	Test	Studie
Schweiz	1996, 1997	Stockenten (<i>Anas platyrhynchos</i>) Tafelenten (<i>Aythya ferina</i>) Reiherenten (<i>Aythya fuligula</i>)	22/409 (5.4) 1/41 (2.4) 2/34 (5.9)	cELISA	Schelling et al. , 1999
Südafrika (intensive ostrich farming area)	1998 Spätherbst, Winter	Wasservögel (diverse Enten, Nilgänse, Ibisse, Kormorane, Störche)	34/46	cELISA	Pfitzer et al. , 2000
Südspanien (Guadalquivir Marshes)	kA	Löffelenten (<i>Anas clypeata</i>) Wasservögel total	kA (1.6) kA (0.2)	kA	Astorga et al. , 1994a
Südspanien (Andalusien)	1989-1991	Stockenten (<i>Anas platyrhynchos</i>) Schnatterenten (<i>Anas strepera</i>) Kolbenenten (<i>Netta rufina</i>) Wassergeflügel total Wasservögel total	3/104 (2.9) 1/50 (2.0) 1/10 (10.0) 5/222 5/317 (1.6)	HAH	Maldonado et al. , 1994
Südspanien (Andalusien)	1990-1992	Stockenten (<i>Anas platyrhynchos</i>) Schnatterenten (<i>Anas strepera</i>) Kolbenenten (<i>Netta rufina</i>) Wassergeflügel total Wasservögel total	5/166 (3.0) 2/80 (2.5) 2/16 (12.5) 9/355 9/507 (1.8)	HAH	Maldonado et al. , 1995
USA (Illinois)	kA	Kanadagänse (<i>Branta canadensis</i>)	19/33	SNT	Page, 1958
USA (Wisconsin, Illinois)	1964, 1965	Kanadagänse (<i>Branta canadensis</i>) Stockenten (<i>Anas platyrhynchos</i>)	40/236 (16.9) 37/267 (13.9)	HAH	Bradshaw & Trainer, 1966
USA (Missouri)	1965	Hausgänse (<i>Anser anser var. dom.</i>)	20/31 (64.5)	HAH	Spalatin & Hanson, 1975
USA (Wisconsin)	1965-1967	Kanadagänse (<i>Branta canadensis</i>)	944/3010 (31.4)	HAH	Palmer & Trainer, 1970

Ort	Zeitraum	Spezies	NW (%)	Test	Studie
USA (Michigan)	1966 Winter	Schwäne (Zucht) (<i>Cygnus spec.</i>)	49/100 (49.0)	HAH	Friend & Trainer, 1970
USA (Illinois, Wisconsin)	1967 Spätfrühling, Sommer	Stockenten (Zucht) (<i>Anas platyrhynchos</i>) (weiblich, männlich. juvenil)	80/200 (40.0) 9/35 (25.7) 6/106 (5.7)	HAH	
USA (Wisconsin)	1978-1980 Herbst	Stockenten (<i>Anas platyrhynchos</i>)	kA (bis 15.7)	HAH	

¹ NW = Nachweise (Anzahl positiver Proben/Gesamtzahl untersuchter Proben)

² kA = keine Angaben

2.3.2 Vorkommen von aviären Paramyxoviren des Serotyps 1 beim Wassergeflügel

Die serologischen Hinweise für einen regen Kontakt des wilden Wassergeflügels mit APMV-1 finden ihre Entsprechung in zahlreichen Virusnachweisen sowohl aus residenten als auch aus ziehenden Enten, Gänsen und Schwänen. Untersuchungen an verschiedenen Orten wiesen regelmäßig sowohl APMV-1 als auch andere APMV-Serotypen nach (Tabelle 2). Die Isolationsraten von APMV-1 schwanken in einem Bereich zwischen 0.1% (Webster *et al.*, 1976) und 15.4% (Rosenberger *et al.*, 1974). Wie die Nachweisrate spezifischer Antikörper, scheint auch die Isolationsrate der APMV von mehreren Faktoren wie Vogelart und Alter sowie Beprobungszeit und -ort abhängig zu sein. Vogelartbedingte Schwankungen der APMV-Nachweishäufigkeit könnten zum einen auf untersuchungstechnischen Faktoren wie der Probenzahl, zum anderen aber auch auf speziesspezifischer Infektionsempfänglichkeit und Ausscheidungsdauer bzw. auf Unterschieden im Verhalten und in der Habitatnutzung beruhen (Stallknecht *et al.*, 1991). Insbesondere Stockenten scheinen häufiger mit APMV-1 infiziert zu sein als andere Wassergeflügelarten (Hinshaw *et al.*, 1980; Vickers & Hanson, 1982a; Ottis & Bachmann, 1983). Bei in Nordrhein-Westfalen beprobten Graugänsen konnten Bolte und Mitautoren (1997) dagegen weder APMV-1 (Organe) noch entsprechende Antikörper feststellen. Jungvögel weisen aufgrund ihrer höheren Empfänglichkeit in der Regel ein allgemein höheres APMV-Vorkommen als adulte Tiere auf (Hinshaw *et al.*, 1980; Vickers & Hanson, 1982a; Kelleher *et al.*, 1985; Stallknecht *et al.*, 1991; Sharp *et al.*, 1993; Stanislawek *et al.*, 2002). Dies könnte den, von einigen Autoren (Kelleher *et al.*, 1985; Stallknecht *et al.*, 1991) beobachteten, leichten Anstieg der APMV-Isolationsrate im Sommer, der Zeit der höchsten Jungvogeldichte erklären. Die häufig festgestellte Wiederabnahme der Isolationsrate im Winter könnte dagegen auf eine, im Anschluss stattfindende Zunahme der Immunität in der Population zurückgeführt werden (Stallknecht *et al.*, 1991). Saisonale Schwankungen der Virusprävalenz scheinen somit, vergleichbar der APMV-Antikörper-Prävalenz, eng mit dem Lebenszyklus der Tiere assoziiert zu sein.

Die Ergebnisse einiger Studien lassen ein endemisches Vorkommen von APMV-1 in bestimmten Wassergeflügelpopulationen oder in von Wassergeflügel stark frequentierten Gebieten vermuten. So wiesen Tůmová und Mitautoren (1984) von 1978-1982 aus verschiedenen Entenarten in zwei Beprobungsgebieten in der Westslowakei sowie Kelleher und Mitautoren (1985) von 1980 bis 1982 aus, mit Wildenten in regelmäßigem Kontakt

stehenden Sentinelenten in Minnesota (USA) jährlich APMV-1 nach. Sharp und Mitautoren (1993) konnten das Virus über einen 15-jährigen Untersuchungszeitraum hinweg kontinuierlich aus Wildenten an Seen in Alberta (Kanada) isolieren.

Bei der Interpretation der Ergebnisse serologischer bzw. virologischer Untersuchungen ist jedoch zu bedenken, dass sie keine exakte Aussage über die tatsächliche Infektionslage in einer Population ermöglichen, da es trotz fehlender Virusausscheidung zu messbaren Antikörperspiegeln bzw. trotz fehlender Antikörper-Titer zu einer Virusausscheidung kommen kann (Vickers & Hanson, 1982a). Deibel und Mitautoren (1985) nehmen zudem eine intermittierende Ausscheidung von APMV an.

Tabelle 2. In virologischen Studien ermitteltes Vorkommen von APMV-1 bzw. APMV beim Wassergeflügel

Ort	Zeitraum	Spezies	Subtyp	NW ¹ (%)	Studie
Australien (Westen)	1977-1979	Enten und Gänse	APMV-1	5/932 (0.5*)	Mackenzie et al. , 1984
Deutschland, Niederlande, Kenia	1977-1980	Enten andere Wasservögel	APMV(1,3,4,6)	39/1446 (2.7*) 10/1101 (0.9*)	Ottis & Bachmann, 1983
Deutschland (Havelland, Gülpert-See)	2001,2002 Juli-Okt.	Enten	APMV (1,4,6) APMV-1	10/50 (20.0*) 3/50 (6.0)	Hlinak et al. , 2006
Finnland	2006	diverses Wassergeflügel (Anseriformes)	APMV-1	6/115 (5.2)	Lindh et al. , 2008
Japan (Ost-Hokkaido)	1978-1981	Enten	APMV APMV-1	7/278 (2.5*) 1/278 (0.4*)	Mikami et al. , 1987
Japan (Hokkaido)	1980-1981	Enten	APMV APMV-1	10/204 (4.9*) 5/204 (2.5*)	Abenes et al. , 1982
Japan	1997-2000	Blässgans (<i>Anas albifrons</i>)	APMV-1	5/92 (5.4*)	Shengqing et al. , 2002a
Kanada (Alberta)	1976-1977 Aug.	Wildenten	APMV APMV-1	69/4827 (1.4*) 58/4827 (1.2*)	Hinshaw et al. , 1980
Kanada (Alberta)	1976-1990	Wildenten	APMV APMV-1	324/12321 (2.6*) 301/12321 (2.4*)	Sharp et al. , 1993
Neuseeland	1997 Jan.-März	Stockente (Anas platyrhynchos)	APMV (1,4) APMV-1	27/321 (8.4*) 10/321 (3.1*)	Stanislawek et al. , 2002
Tschechien (Westslowakei)	1978-1982 Aug.-März	Enten	APMV (1,4,6) APMV-1	29/621 (4.7*) 15/621 (2.4*)	Tümová et al. , 1984

Ort	Zeitraum	Spezies	Subtyp	NW (%)	Studie
USA (California)	1972-1973	Enten	APMV-1	15/3322 (0.5)	Pearson & McCann, 1975
USA (Delaware, Maryland)	1973 Nov.	Kanadagans (<i>Branta canadensis</i>) Krickente (<i>Anas crecca</i>) Wassergeflügel total	APMV-1	8/52 (15.4*) 1/34 (2.9*) 9/159 (6.0)	Rosenberger et al., 1974
USA (Mississippi flyway)	Nov.1974 -Jan.1975	Enten	APMV APMV-1	7/829 (0.8*) 1/829 (0.1*)	Webster et al., 1976
USA (New York)	1977-1983	Enten	APMV (1,2,4,6) APMV-1	89/1440 (6.2*) 71/1440 (4.9*)	Deibel et al., 1985
USA (Wisconsin)	1978-1980 Herbst	Kanadagans (<i>Branta canadensis</i>) Stockente (<i>Anas platyrhynchos</i>) Wassergeflügel total	APMV-1	2/575 (0.3*) 22/829 (2.7*) 28/1454 (1.9*)	Vickers & Hanson, 1982a
USA (Minnesota)	1980-1983 jew.Juni-Nov.	Sentinelenten (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APMV (1,6) APMV-1	98/3652 (2.7) 84/3652 (2.3*)	Kelleher et al., 1985
USA (Pennsylvania)	1983-1984	Enten, Gänse	APMV (1,3,4) APMV-1	16/1068 (1.5*) 12/1068 (1.1*)	Nettles et al., 1985
USA (Maryland)	1983-1984	Enten, Gänse	APMV (1,4,7) APMV-1	10/1506 (0.7*) 6/1506 (0.4*)	
USA (Louisiana)	1986,1987 Nov.	Enten	APMV (1,4,6,8) APMV-1	30/1409 (2.1*) 18/1409 (1.3*)	Stallknecht et al., 1991
USA (Pennsylvania)	1990 Herbst 1991 Sommer	diverses Wassergeflügel (Anseriformes)	APMV-1	4/330 (1.2*)	Alfonso et al., 1995
USA (Alaska), Russland (Sibirien)	1991-1996	Enten, Gänse	APMV-1	47/4196 (1.1*)	Takakuwa et al., 1998

¹ NW = Nachweise (Anzahl positiver Proben/Gesamtzahl untersuchter Proben)

* eigene Berechnung, basierend auf der gegebenen Fallzahl

2.3.3 Krankheitsverlauf und Krankheitsbild

Natürliche Erkrankungsfälle beim Wassergeflügel sind relativ selten und treten in der Regel in Verbindung mit ND-Ausbrüchen bei Hühnern auf. Albiston und Gorrie (1942) berichten über Mortalität bei Enten und Gänsen in Victoria (Australien) und Bush (1954) bei Enten- und Gänseküken auf Haiti. Higgins (1971) beschreibt Erkrankungsfälle bei Enten in Hongkong, Weidenmüller (1972) bei Gänsen in Deutschland und Estudillo (1972) bei Gänsen, Enten und Schwänen in Mexiko. Neben gestörtem Allgemeinbefinden mit Apathie, Depression und Anorexie, wurden in diesen frühen natürlichen Fällen Durchfall (Higgins, 1971; Weidenmüller, 1972), Abfall der Legeleistung sowie Nasen- und Augenausfluss (Higgins, 1971) beobachtet. Estudillo (1972) berichtet ferner über respiratorische Störungen bei Gänsen. Immer wieder wurden auch zentralnervöse Symptome wie Inkoordination, Ataxie, Tremor des Kopfes sowie Paresen der Flügel und Ständer beschrieben (Albiston & Gorrie, 1942; Winmill & Haig, 1961; Estudillo, 1972). Morbidität und Mortalität waren sehr variabel. In wenigen Fällen, insbesondere bei sehr jungen Tieren, erreichte die Mortalität nahezu 100% (Bush, 1954; Winmill & Haig, 1961; Higgins, 1971). ND-Ausbrüche neueren Datums sind die, Ende der 1990er und in den Folgejahren bei domestizierten Gänsen in China mit schweren klinischen Symptomen und vor allem bei Jungtieren mit erhöhten Verlusten einhergehenden Fälle (Liu *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004). Velogene NDV-Stämme konnten als Krankheitsursache identifiziert (Liu *et al.*, 2003) und die Symptome in Gänsen erfolgreich experimentell reproduziert werden (Wan *et al.*, 2004). Erkrankte Tiere zeigten ähnlich wie in den frühen Berichten Depression, Anorexie, Durchfall und zum Teil gegen Ende der Erkrankung auch zentralnervöse Symptome. Morbidität und Mortalität wurden bei den natürlichen Ausbrüchen auf 17,5% bzw. 9,5% geschätzt (Wan *et al.*, 2004).

Angehen, Grad, Dauer und Verlauf klinischer ND hängen beim Wassergeflügel, wie bei Hühnern von diversen Faktoren ab (Alexander & Senne, 2008). Auf der einen Seite spielen die Vogelart sowie Alter, Immunstatus und Gesundheitszustand des Tieres eine Rolle. Al Imadi und Tanyi (1982) beobachteten eine höhere Krankheitsempfänglichkeit bei eintägigen sowie zwei- bis vierwöchigen Gänseküken im Vergleich zu gleichaltrigen Entenküken. Daneben wird das Krankheitsgeschehen von äußeren Faktoren, wie physischem und sozialem Stress beeinflusst. Bozorgmehri-Fard und Keyvanfar (1979) berichten über einen

spontanen ND-Ausbruch bei Krickenten nach, durch Fang und Einsperrung bedingtem Stress. Von überragender Bedeutung sind auf der anderen Seite natürlich der NDV-Stamm (Pathotyp), die Virusdosis und der Infektionsweg (s. Abschnitt 2.3.4).

Über die Inkubationszeit und die Krankheitsdauer ist beim Wassergeflügel nur wenig bekannt. Die Angaben in der Literatur stützen sich gewöhnlich auf die Ergebnisse experimenteller Studien. Nach den Beobachtungen von Al Imadi und Tanyi (1982) sowie Wan und Mitautoren (2004) beträgt die Inkubationszeit nach experimenteller Infektion mit velogenen NDV in der Regel drei oder mehr Tage. Bei mit velogenem NDV infizierten eintägigen Gänseküken stellten Al Imadi und Tanyi (1982) eine Krankheitsdauer von ein bis fünf Tagen fest. Laut Higgins (1971) schwankte die Dauer des Krankheitsverlaufes in der Herde, vom Auftreten der ersten Symptome bis zur vollständigen Erholung der überlebenden Enten, nach einer natürlichen Infektion zwischen 12 und 20 Tagen. Wan *et al.* (2004) berichten über eine Häufung von Todesfällen zwischen Tag 3 und 12 p.i..

2.3.4 Anfälligkeit des Wassergeflügels für klinische Erkrankung nach Infektion mit unterschiedlichen Pathotypen der aviären Paramyxoviren des Serotyps 1

Wassergeflügel ist zwar empfänglich für eine Infektion mit APMV-1 aller Pathotypen, im Vergleich zu Hühnervögeln erwies es sich jedoch als relativ resistent gegenüber klinischer Erkrankung. Die Mehrzahl der bisher aus Wassergeflügel isolierten APMV-1-Stämme ist von geringer Virulenz für Hühner (Rosenberger *et al.*, 1974; Spalatin & Hanson, 1975; Bahl *et al.*, 1977; Vickers & Hanson, 1982b; Mackenzie *et al.*, 1984; Alexander, 1995; Pfitzer *et al.*, 2000; Zanetti *et al.*, 2005; Globig, 2007). Die im Rahmen der entsprechenden epidemiologischen Untersuchungen (s. Abschnitt 2.3.1, 2.3.2) beprobten Tiere zeigten keinerlei Anzeichen einer Erkrankung. Dies führte zu der Annahme, dass lentogene NDV keine Krankheitssymptome beim Wassergeflügel verursachen. Auch natürliche Infektionen mit mesogenen APMV-1-Stämmen scheinen beim Wassergeflügel in der Regel keine klinische ND hervorzurufen. Kawamura *et al.* (1987) isolierten aus gesund erscheinenden Wildenten ein APMV-1 mit nach dem Intracerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) mesogenen Eigenschaften, das bei spezifisch pathogenfreien eintägigen Hühnerküken nach intranasaler bzw. intraperitonealer

Applikation ND-Symptomatik hervorrief. Durch velogene APMV-1 verursachte natürliche Erkrankungsfälle werden bei Enten, Gänsen und Schwänen sehr selten beobachtet und stehen in der Regel in Verbindung mit Ausbrüchen bei Hühnervögeln (Abschnitt 2.3.3). Nach einer Infektion mit für Hühnervogel hochvirulenten APMV-1-Stämmen ist eine klinische Erkrankung nicht obligat. So isolierten Echeonwu und Mitautoren (1993) aus gesund erscheinenden Wildenten in Nigeria NDV-Stämme, die nach Mittlerer Absterberate (MDT), ICPI und Intravenösem Pathogenitätsindex (IVPI) als velogen zu beurteilen waren.

Experimentelle Infektionsstudien scheinen, trotz der Variabilität der Ergebnisse, die im Vergleich zu Hühnern höhere Krankheitsresistenz des Wassergeflügels zu bestätigen. Nach intranasaler und konjunktivaler Infektion von eintägigen sowie älteren Pekingenten und Gänsen, mit hohen Dosen eines lentogenen (LaSota) sowie eines mesogenen (Hertfordshire) APMV-1-Stammes, konnten trotz kurzfristiger Virusvermehrung im Pharynx und Ausscheidung mit der Schnabelflüssigkeit keine klinischen Symptome beobachtet werden (Al Imadi & Tanyi, 1982). Mit der 100-fachen Hühnerdosis des lentogenen Stammes La Sota infizierte Gänse erkrankten ebenfalls nicht (Bolte *et al.*, 2001). Auch gegenüber der experimentellen Infektion mit für Hühner hochvirulenten APMV-1 erwies sich Wassergeflügel als verhältnismäßig resistent (Page, 1958; Fortner *et al.*, 1959). In Studien von Iyer (1945) zeigten adulte Enten nach Infektion mit virulentem NDV weder klinische Symptome noch bildeten sie neutralisierende Antikörper. In anderen Infektionsversuchen war eine intravenöse bzw. intramuskuläre Applikation hoher Dosen, für Hühner virulenter NDV nötig, um bei Enten bzw. Gänsen (Friend & Trainer, 1972; Bolte *et al.*, 2001) sowie Küken von Enten und Gänsen (Al Imadi & Tanyi, 1982) mehr oder weniger schwere klinische Symptome hervorzurufen. Entenembryonen zeigten sich jedoch gegenüber einer APMV-1-Infektion genauso empfänglich wie Hühnerembryonen (Funk, 1954). In Experimenten von Spalatin und Hanson (1975) entwickelte nur eine von 13 adulten, mit velogenem NDV infizierten Kanadagänsen schwere Symptome und verstarb.

ND stellte also bisher bei domestiziertem Wassergeflügel selbst kein wirtschaftlich bedeutendes Problem dar. Die seit 1997 auftretenden, z.T. verlustreichen APMV-1-Ausbrüche bei domestizierten Gänsen in China gaben jedoch Anlass zu detaillierteren Untersuchungen, was die Empfänglichkeit dieser Vogelspezies für klinische ND angeht. Die daraufhin durchgeführten experimentellen Infektionsstudien an Gänsen, unter eindeutig

nachvollziehbaren Versuchsbedingungen und mit genau definierten Genotypen velogener APMV-1 unterschiedlicher Herkunft, bestätigen die schon früh vermutete hohe Krankheitsresistenz dieser Spezies gegenüber einigen für Hühner hochpathogenen Stämmen. Sie weisen jedoch auch auf eine zumindest bei Gänsen starke Genotypgebundenheit dieser Resistenz hin (Wan *et al.*, 2004). So erwies sich der velogene Stamm Herts/33, in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Bolte und Mitautoren (2001), in denen auch mit hohen Dosen dieses Stammes nur bei zwei von sieben naiven Gänsen Krankheitssymptome induziert werden konnten, auch hier als wenig pathogen für Gänse. Während dieser Stamm in den Genotyp IV einzuordnen ist, gehören die für Gänse virulenten Stämme dagegen nach Liu und Mitautoren (2003) den Genotypen VI, VII, VIII und IX an. Die seit 1997 in vielen Provinzen Chinas zu verlustreichen Ausbrüchen klinischer ND bei Gänsen führenden APMV-1-Stämme sind überwiegend dem Genotyp VIId, dem aktuell in China auch bei Hühnern meistvertretenen Genotyp zuzuordnen und zeichnen sich außerdem durch das auffällige Merkmal sechs zusätzlicher Nukleotide aus (Xu *et al.*, 2008).

2.3.5 Pathologische Befunde

Die makroskopischen Veränderungen post mortem sind bei akuter ND auch beim Wassergeflügel sehr variabel und können nicht als pathognomonisch angesehen werden. Häufig fehlen sie auch ganz (Alexander & Senne, 2008). Estudillo (1972) beobachtete bei, an einer NDV-Infektion verendeten Gänsen und Enten Blutungen in Myokard, Lunge und Duodenum sowie vermehrte Blutfülle innerer Organe. Bei ebenfalls natürlich infizierten Enten fand Higgins (1971) relativ häufig katarrhalische Konjunktivitis, Tracheitis und Sinusitis sowie eine gestaute Leber. Weidenmüller (1972) beobachtete bei, im Verlauf eines ND-Ausbruchsgeschehens erkrankten Gänsen Hämorrhagien in der Trachea, ausgeprägte Petechien im Drüsenmagen sowie Nekrosen in der Darmschleimhaut. Bozorgmehri-Fard und Keyvanfar (1979) berichten bei natürlich erkrankten Krickenten von verdunkelter Muskulatur und Petechien auf den inneren Organen. Experimentell mit velogenem APMV-1 infizierte eintägige Gänseküken zeigten milde bis schwere Gastroenteritis, katarrhalische Entzündung der Nasenschleimhaut, Hyperämie und Ödem der Lunge sowie in einigen Fällen Hämorrhagien am Herzen (Al Imadi & Tanyi, 1982). Wan und Mitautoren (2004) fanden in

allen, mit velogenen NDV unterschiedlicher Genotypen infizierten Gänsen multifokale Läsionen im Digestionstrakt und in den lymphoiden Organen. Auch sie beobachteten sehr häufig Hämorrhagien und Petechien.

2.3.6 Differentialdiagnosen

Aufgrund des variablen Krankheitsbildes ohne pathognomonisch verwertbare Symptome existiert eine ganze Reihe von Differentialdiagnosen, die je nach Spezies, Alter und vorrangigen Symptomen der betroffenen Tiere in Frage kommen (Heider & Monreal, 1992; Siegmann, 1993; Saif *et al.*, 2008). Primär ist an Faktoren oder Erreger zu denken, die ebenfalls zentralnervale, respiratorische bzw. enterale Störungen hervorrufen. Neben dem großen Komplex der managementassoziierten Faktoren wie Futter, Trinkwasser- und Frischluftversorgung sind hier insbesondere durch andere Viren oder durch Bakterien verursachte Erkrankungen differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehen. Bei den Viruserkrankungen (Tabelle 3a) ist, aufgrund des ähnlich unspezifischen Krankheitsbildes mit vergleichbarem Verlauf, an erster Stelle an aviäre Influenza (Kaleta, 1992), gefolgt von Parvovirose, Entenhepatitis und Entenpest zu denken. Was die bakteriellen Erreger betrifft, kommen primär Pasteurellen, Salmonellen und insbesondere beim Wassergeflügel *Riemerella anatipestifer* in Frage (Tabelle 3b). Zu berücksichtigen ist ferner, dass eine vor der Infektion mit APMV-1 bestehende oder sekundär hinzukommende Infektion mit den genannten oder anderen Erregern das Krankheitsbild sowie den Verlauf maßgeblich mitbestimmen kann. Nicht zuletzt müssen Mykotoxikosen oder Vergiftungen anderer Art ausgeschlossen werden.

Tabelle 3a. Virale Differentialdiagnosen zur Newcastle Disease beim Wassergeflügel

VIREN	Manifestationsalter (Wochen)										Symptome													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	älter	DF	ORIT	uRIT	Auge	BA	ZNS	H/A	EwZ	LL	IKZ			
Reoviren Gänse (Inf. Myokarditis der Gösse)	Mortalität z. T. > 60% Todesfälle perakut oder nach 1-2 d möglich																							
Polyomavirus (HNE der Gänse)	Mortalität 10-80% klinische Symptome meist nur wenige h vor dem Tod																							3-6d
Parvoviren (Parvovirose)	Verluste v.a. zw. 5. u. 8. LeTa (Mortalität -100%) fibrinöse Pseudomembranen in der Schnabelhöhle																							6-15d
Picornaviren (Entenvirushepatitis)	Mortalität: -95% (1. LeWo); -50% (2./3. LeWo) sehr rascher Verlauf; Ruderbew. in Seitenlage																							2-10d
Reoviren Enten (Reovirusinf. der Flugenten)	Mortalität 10-50%; Morbidität 30-100% Tod erst nach längerer Krankheitsdauer																							1(-5)d
AIV (Aviäre Influenza)	Erkrankung und erhöhte Mortalität bei hochpathogenen Stämmen oder Begleitinfektionen																							3-7d
APMV-1 (Newcastle Disease)	Erkrankung und erhöhte Mortalität (-100%) bei bestimmten vNDV-Stämmen																							h-d
Herpesviren (Entenpest, GänseHV-Inf.)	Mortalität altersabhängig 5-100% (ältere Tiere empfänglicher) Todesfälle meist 1-5 d nach ersten klinischen Symptomen																						3-8d	

DF = Durchfall

oRIT = Störungen des oberen Respirationstrakts (z.B. Nasenausfluss, Sinusitis)

uRIT = Störungen des unteren Respirationstrakts (z.B. erhöhte Atemfrequenz, Dyspnoe)

Auge = Krankheitssymptome am Auge (z.B. Augenausfluss, verklebte Augenlider, Lidödem, Konjunktivitis)

BA = Störungen des Bewegungsapparates (Bewegungsschwierigkeiten)

ZNS = zentralnervale Symptome (z.B. Inkoordination, Ataxie, Lähmungen, Zittern, Tortikollis, Opisthotonus)

H/A = Veränderungen an Haut und Anhangsorganen (z.B. Verfärbungen, Befiederungsstörungen)

EwZ = schlechter Entwicklungszustand (Kümmern)

LL = Abfall der Legeleistung

IKZ = Inkubationszeit (h = Stunde(n), d = Tag(e))

Wo, LeWo, LeTa = Woche, Lebenswoche, Lebenstag

HNE = Hämorrhagische Nephritis Enteritis

BAKTERIEN	Manifestationsalter (Wochen)										Symptome														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	älter	DF	ORIT	uRIT	Auge	BA	ZNS	H/A	EWZ	LL	IKZ				
Listeria monocytogenes (Listeriose)	Mortalität Junggeisse -40% septikämische oder enzephalitische Form; oft hochletal																								
Aeromonas hydrophila (Aeromonadose)	v.a. im Sommer einzelne plötzliche Todesfälle; oft innerhalb von 24-48 h																								1-3d
Clostridium botulinum (Botulismus)	Mortalität kann sehr hoch sein; v.a. in wärmeren Monaten schlaaffe Lähmungen nach kranial fortschreitend																								h-3d

DF = Durchfall

oRIT = Störungen des oberen Respirationstrakts (z.B. Nasenausfluss, Sinusitis)

uRIT = Störungen des unteren Respirationstrakts (Dyspnoe)

Auge = Krankheitssymptome am Auge (z.B. Augenausfluss, verklebte Augenlider, Lidödem, Konjunktivitis, Nickhautvorfall)

BA = Störungen des Bewegungsapparates (z.B. Ballenentzündung, Arthritis, Lahmheit)

ZNS = zentralnervale Symptome (z.B. Inkoordination, Ataxie, Lähmungen, Zittern, Tortikollis, Opisthotonus, Krämpfe)

H/A = Veränderungen an Haut und Anhangsorganen (z.B. Verfärbungen, Blässe, Zyanose, Dermatitis)

EWZ = schlechter Entwicklungszustand (Kümmern)

LL = Abfall der Legeleistung

IKZ = Inkubationszeit (h = Stunde(n), d = Tag(e), m = Monat(e))

Wo, LeWo, LeTa = Woche, Lebenswoche, Lebenstag

c = chronisch

2.3.7 Virusausscheidung

Die Ausscheidung von APMV-1 durch infizierte Enten und Gänse ist neben den oben erwähnten Felduntersuchungen durch zahlreiche experimentelle Studien belegt. Die Virusausscheidung über die Kloake scheint von größerer Bedeutung zu sein als die über die Trachea (Webster *et al.*, 1976; Shortridge, 1978; Abenes *et al.*, 1982; Wobeser, 1997; Stanislawek *et al.*, 2002). Über die Ausscheidungsdauer bei natürlich infiziertem Wassergeflügel ist nichts bekannt und experimentelle Untersuchungen liefern variable Ergebnisse. Asplin (1947) beobachtete bei experimentell infizierten Enten und Gänsen ab dem 3. bzw. 4. Tag p.i. eine für drei bis vier Tage anhaltende APMV-1-Ausscheidung. Vickers und Hanson (1982a) konnten bei experimentell infizierten Stockenten für 10 bis 16 Wochen Virus aus Tracheal-, Oesophageal- bzw. Kloakentupfern isolieren. Winmill und Haig (1961) gelang der Nachweis von NDV aus Darminhalt von Enten sogar noch 6 Monate nach dem Kontakt mit erkrankten Hühnern. Infektionsstudien lassen vermuten, dass APMV-1 in Gänsen weniger stark replizieren als in Enten, weshalb die Virusausscheidung, wenn überhaupt, nur von kurzer Dauer ist. Spalatin und Hanson (1975) konnten in keiner der, über 15 Tage täglich untersuchten Kotproben von, mit dem velogenen NDV-Stamm Trinidad infizierten Gänsen APMV-1 nachweisen. Auch Bolte und Mitautoren (2001) konnten bei keiner der geimpften und/oder mit velogenem NDV infizierten Gänse Virus aus Rachen- und Kloakentupfern isolieren. Als weiteren Beweis für eine schwache bzw. fehlende Virusreplikation in Gänsen sehen Bolte und Mitautoren (2001) das Fehlen von Antikörpern bei den Kontrolltieren, trotz deren engem Kontakt zu, mit velogenem NDV infizierten Artgenossen, an. Dem entgegen stehen jedoch die Erkenntnisse aus neueren Untersuchungen von Wan und Mitautoren (2004), die eine Übertragung velogener APMV-1 über den Kot, von Gänsen auf Hühner belegen, wobei auch hier, wie im Falle des Auftretens klinischer Symptome, der Genotyp des verwendeten NDV-Stammes ausschlaggebend zu sein scheint. Welche Rolle Reinfektionen bei der Ausscheidungsdauer spielen, oder ob vielleicht sogar persistente Infektionen auftreten, ist nicht geklärt. Auf jeden Fall kann die beobachtete lange Ausscheidungsdauer das Fortbestehen eines ND-Infektionsgeschehens in einer Population entscheidend erleichtern. Schon eine geringe Anzahl, das Virus über längere Zeit beherbergender Tiere kann ausreichen, eine NDV-Infektion über Zeiträume geringerer Populationsdichte (z.B. die Brutzeit) hinaus aufrechtzuerhalten (Matumoto, 1969;

Vickers & Hanson, 1982a). Da wiederholt gefangene und beprobte Enten eine höhere APMV-Prävalenz aufwiesen als einfach beprobte, vermuteten Deibel und Mitautoren (1985) bei diesen Tieren zudem eine intermittierende Ausscheidung. Vickers und Hanson (1982a) nahmen aufgrund ihrer experimentellen Beobachtungen außerdem an, dass die Virusausscheidung bei Stockenten zur Brutzeit stimuliert wird.

2.3.8 Epidemiologische Rolle des Wassergeflügels

Endgültige Klarheit über die Bedeutung des Wassergeflügels bei der Einschleppung und Verbreitung von APMV-1 besteht noch nicht (Alexander, 1995, 2001). Aufgrund der zahlreichen APMV-1-Nachweise aus wilden Wasservögeln, insbesondere aus den relativ krankheitsresistenten Enten, Gänsen und Schwänen, gelten diese Vögel jedoch als potentiell APMV-1 Reservoir (Kaleta & Baldauf, 1988; Werner, 1988; Telbis *et al.*, 1989; Stallknecht *et al.*, 1991; Alexander *et al.*, 1992; Takakuwa *et al.*, 1998; Hlinak *et al.*, 1998). Der Vogelzug birgt ferner das schwer kontrollierbare Risiko einer Verschleppung von APMV-1 über weite Entfernungen. Ottis und Bachmann (1983) berichten von höheren APMV-1 Isolationsraten in der Hauptmigrationszeit zwischen August und November. Ein aus einer Spießente (*Anas acuta*) in Japan isolierter APMV-1-Stamm zeigte große Ähnlichkeit mit Isolaten aus dem Fernen Osten, entsprechend der Zugroute dieser Entenart (Sakai *et al.*, 2007). Takakuwa und Mitautoren (1998) vermuten, dass die Hauptbrutgebiete von Enten in Alaska kalt genug sind, um ein Überdauern von APMV-1 über lange Zeit und damit eine ständige Reinfektion von aus dem Süden zurückkehrenden Vögeln zu ermöglichen. Vor allem von Enten wird vermutet, dass sie wegen der im Vergleich zu Gänsen höheren APMV-1-Isolationsrate als latente Träger und Langzeitausscheider verschiedener APMV-1-Pathotypen fungieren (Kaleta *et al.*, 1999).

Eine Ansteckung von wildem und domestiziertem Wassergeflügel beim Wirtschaftsgeflügel ist, aufgrund der beschriebenen Erkrankungsfälle in Verbindung mit Ausbrüchen beim Wirtschaftsgeflügel, sehr wahrscheinlich (siehe Abschnitt 2.3.3). Asplin (1947) und Funk (1954) berichten bei Enten nach Kontakt zu, mit APMV-1-infizierten und erkrankten Hühnern von Serokonversion bzw. subklinischer Infektion.

Eindeutige Beweise für die Übertragung von APMV von Wildvögeln auf das Nutzgeflügel gibt es hingegen bisher nicht (Alexander, 1982). Shortridge und Mitautoren (1980) berichten über die Isolation von APMV-6 aus domestizierten Enten, die an Teichen gehalten wurden, an denen auch wilde Wasservögel anzutreffen waren. Kelleher und Mitautoren (1985) lieferten den serologischen Hinweis für die Übertragung von APMV von Sentinelen auf zugestellte Puten. Jørgensen und Mitautoren (2004) isolierten aus wildem Wassergeflügel sowie aus kommerziell gehaltenen Fasanen und Straußen mit möglichem Kontakt zu Wildvögeln APMV-1 derselben genetischen Gruppe. Den experimentellen Beleg für eine Übertragung velogener APMV-1 von erkranktem domestiziertem Wassergeflügel, über direkten Kontakt bzw. Kot, auf Hühner erbrachten Wan und Mitautoren (2004). Diese Tatsache widerlegt frühere Vermutungen (Bolte *et al.*, 2001), dass Gänsen aufgrund mangelnder Virusausscheidung keine bedeutende Rolle in der ND-Epidemiologie zukommen könne und erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von APMV-1 auch von wildem Wassergeflügel auf Nutzgeflügel. Diese ist, wie von Wan und Mitautoren (2004) gezeigt, direkt durch Tierkontakt, aber auch indirekt über Kot, kontaminiertes Wasser oder andere, sich an Wassergeflügel ansteckende Wildvögel vorstellbar. Die höchste Wahrscheinlichkeit einer Übertragung auf Hausgeflügel besteht somit in Gegenden, wo Freiland-Geflügelbestände in unmittelbarer Nähe zu Habitaten wilden Wassergeflügels lokalisiert sind (Hopkins *et al.*, 1990).

Da die aus Wildvögeln isolierten APMV-1 in der Regel lentogen bzw. apathogen sind und nach einem Eintrag in Geflügelbestände bestenfalls zur Bildung einer Immunität bei den empfänglichen Tieren führen würden, scheint ein Zusammenhang von ND-Ausbrüchen beim Wirtschaftsgeflügel mit einem Viruseintrag durch das Wassergeflügel in vielen Fällen wenig plausibel. Im Zusammenhang mit Ausbrüchen beim Wirtschaftsgeflügel besteht jedoch prinzipiell die Möglichkeit der Weiterverschleppung virulenter NDV durch Wildvögel (Alexander, 1995, 2001). Isolationen velogener APMV-1-Stämme aus gesund erscheinendem Wassergeflügel wurden von Echeonwu und Mitautoren (1993) für Wildenten und von Shortridge (1978) sowie Majiyagbe und Nawathe (1981) für domestiziertes Wassergeflügel beschrieben.

In seiner Funktion als Virusreservoir beherbergt das Wassergeflügel außerdem einen potentiell risikoreichen Pool genetischen Materials (Wobeser, 1997). In überfüllten Überwinterungs- und Mausergebieten werden zudem hohe zwischen- und innerartliche Passageraten ermöglicht (Wobeser, 1997; Müller *et al.*, 1999). Insbesondere die Seuchengeschehen in Irland und Australien deuten darauf hin, dass APMV-1-Stämme geringer Virulenz durch Mutation in solche hoher Virulenz übergehen können. Die 1990 bei Ausbrüchen in Irland aus Hühnern isolierten Stämme (z.B. NDV-Isolat 34/90) unterschieden sich antigenetisch und genetisch deutlich von klassischen virulenten NDV, bildeten jedoch eine gemeinsame phylogenetische Gruppe mit apathogenen Isolaten aus wilden Enten und anderen Wasservögeln, was auf die Herkunft aus einem gemeinsamen Genpool hindeutet (Alexander *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1993, 1998; Huovilainen *et al.*, 2001). Die von 1998 bis 2000 in Australien auftretenden ND-Ausbrüche sind nachweislich auf eine pathogene Mutante eines endemischen apathogenen APMV-1-Stammes zurückzuführen (Kirkland, 2000; Westbury, 2001; Gould *et al.*, 2001, 2003). Diese Mutante steht phylogenetisch in enger Verbindung mit APMV-1 des Genotyps I der Klasse II, für die Wildvögel als primäres Reservoir gelten (Gould *et al.*, 2003; European Food Safety Authority, 2007). Takakuwa und Mitautoren (1998) isolierten aus, in Alaska und Sibirien brütenden Zugenten APMV-1, deren F-Protein ein, für velogene APMV-1 typisches Spaltstellenmotiv (multiple basische Aminosäuren) aufwies. Während die ermittelte MDT ebenfalls für einen velogenen Pathotyp sprach, lagen sowohl der ICPI als auch der IVPI bei 0.00. Diese Funde belegen das Vorkommen potentiell virulenter NDV-Stämme bei ziehendem Wassergeflügel.

Bis auf wenige Ausnahmen dieser Art sind die aus Wassergeflügel isolierten APMV-1 jedoch primär lentogen, weshalb Alexander (2001) vermutet, dass eine Virulenzsteigerung in der Regel erst im empfänglichen Wirtschaftsgeflügel stattfinden muss. Während des Ausbruchsgeschehens in Australien war es zum Beispiel nicht möglich, aus den als Primärreservoir für APMV-1 des Genotyps I geltenden Wildvögeln pathogene APMV-1-Stämme zu isolieren (Gould *et al.*, 2001, 2003; European Food Safety Authority, 2007). Islam und Mitautoren (1994) konnten über die Passagierung eines mesogenen NDV-Stammes aus Wachteln in Hühnergehirnen eine Steigerung der Virulenz für Hühner nachweisen. Shengqing und Mitautoren (2002b) erbrachten den Beweis, dass ein apathogener, aus Gänsen isolierter APMV-1-Stamm durch mehrmalige Passagen in Hühnern in einen velogenen Pathotyp übergehen kann.

2.3.9 Impfung des Wassergeflügels gegen die Newcastle Disease

2.3.9.1 Situation in Deutschland

Nach der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit (GP-VO) vom 20. Dezember 2005 unterliegt die ND bei Hühnern und Puten in Deutschland der Bekämpfungspflicht. Wichtiger Bestandteil der Bekämpfungsmaßnahmen ist die Impfung, die in Deutschland aktuell nur für Hühner und Puten gesetzlich vorgeschrieben ist (GP-VO §7(1)). Der Tierbesitzer hat die durchgeführten Impfungen zu dokumentieren und durch Wiederholungsimpfungen eine ausreichende Immunität aller Tiere im Bestand sicherzustellen.

Das Wassergeflügel gilt seit geraumer Zeit als NDV-Reservoir (Abschnitt 2.3.8) und im Vergleich zu Hühnervögeln als relativ resistent gegenüber der klinischen Ausprägung der ND (Abschnitt 2.3.4). Eine Impfung soll bei diesen Vögeln daher in der Regel weniger dem direkten Schutz vor Erkrankung, sondern vielmehr dem Zweck dienen, die Replikation von für Hühnervogel hochpathogenen NDV in diesen Wirten möglichst gering zu halten und damit eine anschließende Virusausscheidung, mit der Gefahr der Virusverschleppung und Übertragung auf empfänglichere Vogelarten, weitgehend zu verhindern. Schon früh wurde deshalb die Einbeziehung des Wassergeflügels in die Bekämpfungsprogramme erwogen. Heller (1957) sah das Wassergeflügel aufgrund eigener Beobachtungen als potentiellen latenten Virusträger an und forderte dessen Berücksichtigung bei der Bekämpfung der ND. Doch erst mit der Neufassung der GP-VO vom 21. Dezember 1994 wurde die Impfpflicht unter bestimmten Voraussetzungen auch auf das Wassergeflügel ausgedehnt: „Werden Hühner oder Truthühner in einem Gehöft oder sonstigen Standort mit anderem Geflügel zusammen gehalten, gilt die Verpflichtung nach Absatz 1 (d. i. Impfpflicht, ausreichende Immunität) auch für das andere Geflügel“ (GP-VO §7 (3)). Bereits mit der Änderung der GP-VO vom 24. November 1995 wurde diese Regelung aber wieder revidiert, unter anderem deshalb, weil für anderes Geflügel als Hühner, Puten und Tauben bisher keine zugelassenen ND-Impfstoffe zur Verfügung stehen. Unabhängig davon wird für bestimmte Anlässe, wie Ausstellungen, eine Impfung auch für das Wassergeflügel gefordert. Gegen die Newcastle-Krankheit darf nur mit Impfstoffen geimpft werden, die der Entscheidung 93/152/EWG der

Kommission vom 8. Februar 1993 über die Kriterien für Impfstoffe für Routineimpfungen gegen die Newcastle-Krankheit (ABl. EG Nr. L 59 S. 35) entsprechen (GP-VO §5 (2)). Als Lebendimpfstoffe sind nur lentogene Stämme erlaubt. Die überwiegend verwendeten Impfstämme sind Hitchner B1, La Sota und Clone 30. In Deutschland für Hühner, Puten bzw. Tauben zugelassen sind Impfstoffe von Merial GmbH, Lohmann Animal Health GmbH und Co. KG, Fort Dodge Veterinär GmbH und Intervet Deutschland GmbH (Paul-Ehrlich-Institut, http://www.pei.de/cln_115/nn_161774/DE/arsneimittel/vet-mittel/gefluegel/gefluegel-node.html?__nnn=true). Es handelt sich dabei um Einfach- bzw. Kombinationsimpfstoffe aus bis zu vier Komponenten. Sowohl attenuierte Lebendvakzinen als auch Totvakzinen stehen zur Verfügung.

2.3.9.2 Impfstudien beim Wassergeflügel

Berichte bzw. Untersuchungen zu Immunogenität, Verträglichkeit und Schutzwirkung von ND-Impfstoffen bei Enten und Gänsen sind spärlich und lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Higgins (1971) zweifelte, aufgrund des Fehlens spezifischer HAH-Antikörper in Seren NDV-infizierter Enten, die Immunogenität von ND-Vakzinen bei dieser Spezies an und stellte die Effektivität der damals in Hongkong schon breitflächig praktizierten Impfung von Enten in Frage. Grund und Mitautoren (1997) konnten dagegen sowohl bei Hausgänsen als auch bei Moschusenten nach Immunisierung mit einem Inaktivatimpfstoff für Hühner eine im HAH deutlich messbare, anhaltende Serokonversion hervorrufen. Bolte (1998) erzielte bei Hausgänsen nur mit der 100-fachen Dosis eines Lebendimpfstoffes für Hühner (La Sota) eine vorübergehende, im HAH und Virusneutralisationstest messbare Antikörper-Antwort. Eine Primär- bzw. Auffrischungsimpfung mit einem Inaktivatimpfstoff erbrachte dagegen bessere Erfolge, was die Immunreaktion, nicht jedoch, was die zeitliche Persistenz der Antikörpertiter betrifft. Aufgrund der festgestellten hohen Resistenz der nicht vakzinierten Kontrolltiere gegenüber dem, für die Belastungsinfektion verwendeten velogenen APMV-1 (Herts/33), der bei geimpften und ungeimpften Tieren nicht feststellbaren Ausscheidung desselben sowie der mangelhaften serologischen Reaktion auf den Lebendimpfstoff, erachtet Bolte (1998) jedoch eine Impfung von Gänsen nicht als zwingend notwendig. Mit dem Ziel, ein möglichst wirksames und protektives Impfregime, zur Bekämpfung der durch

gänsepathogene NDV-Stämme in China verursachten Ausbrüche zu etablieren, führten Dai und Mitautoren (2008) erst kürzlich in großem Rahmen Wirksamkeitsstudien mit diversen kommerziellen Impfstoffen bei domestizierten Gänsen durch. Die Effizienz der Vakzinen wurde sowohl serologisch, anhand der Bestimmung des HAH-Titers, als auch durch Belastungsexperimente mit einem gänsepathogenen Feldstamm analysiert. Auch diese Untersuchungen bestätigen die geringe Immunogenität und Schutzwirkung einer einmalig applizierten La Sota-Lebendvaccine. Ähnlich schlechte Ergebnisse wurden mit einer ND-Lebendvaccine, die das AIV-H5-Gen zur Expression bringt erzielt. Mit einem La Sota-Inaktivimpfstoff waren die Gänse dagegen zumindest 21 Tage nach Vakzination gegenüber einer Belastungsinfektion geschützt und als protektiv bewertete HAH-Titer von 4 (\log_2) waren für einen Zeitraum von sechs Wochen messbar. Die beste Immunantwort und längste vollständige Schutzwirkung von bis zu 4 Monaten wurde erreicht, wenn auf die primäre Immunisierung mit La Sota-Lebendimpfstoff eine Auffrischungsvakzination mit einer Lebendvaccine auf der Basis des mesogenen Stammes Muktsesar folgte.

2.4 Newcastle-Disease - Diagnostik

Die sich aus dem, bei empfänglichen Geflügelarten mit hoher Morbidität und Mortalität einhergehenden typischen Verlauf und der raschen Ausbreitung ergebende große Bedeutung der Newcastle Disease erfordert eine leistungsfähige Diagnostik, die sowohl den direkten Virusnachweis mit anschließender Typisierung des Erregers als auch den, zur Kontrolle von Impfprogrammen und für epidemiologische Untersuchungen benötigten Antikörperrnachweis einschließt.

2.4.1 Virusnachweis

Aus Organ- oder Gewebeproben kann Virus bzw. Antigen zwar unmittelbar durch immunhistologische Methoden, wie Immunfluoreszenztest (IF-Test) (Maestrone & Coffin, 1964) und Immunperoxidasetest (IP-Test) (Lockaby *et al.*, 1993) oder über eine elektronenmikroskopische Untersuchung detektiert werden (Kaleta, 1992). Ein negatives

Ergebnis schließt jedoch das Vorhandensein einer Virusinfektion nicht aus. Zudem ist eine weitere Virustypisierung nicht möglich.

Der direkte Virus- oder Genomnachweis über die Anzucht bzw. über molekularbiologische Methoden bestätigt dagegen eindeutig das Vorhandensein einer Infektion und ermöglicht außerdem eine weitere Charakterisierung (Serotypisierung, Genotypisierung, Pathotypisierung). Letztere ist aufgrund der extremen Virulenzunterschiede innerhalb der APMV-1, des universellen Vorkommens lentogener Stämme und des regen Einsatzes von Lebendvakzinen für das weitere seuchenhygienische Vorgehen von wesentlicher Bedeutung. Das Office International des Épizooties (O.I.E.) (2008) und die EU (92/66/EWG) schreiben deshalb eine Virusisolierung in 9- bis 11-tägigen, embryonierten, spezifisch pathogenfreien Hühnereiern vor. Ausgangsmaterial hierfür sind bei lebenden Tieren Tupferproben aus Kloake und Trachea bzw. frische Fäzes und bei toten Tieren oro-nasale Tupfer, Organ- und Gewebeproben von Trachea, Lunge, Nieren, Milz, Gehirn, Leber und Herz sowie Darm mit Darminhalt. Die Proben werden mit antibiotikahaltiger Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) suspendiert, gegebenenfalls zerkleinert und nach 1- bis 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur, durch Zentrifugation geklärt. Pro Probe sollten mindestens vier bis fünf Eier in die Allantoishöhle beimpft und für vier bis sieben Tage bei 35 bis 37°C inkubiert werden. Unmittelbar nach dem Absterben der Embryonen bzw. nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Amnioallantoisflüssigkeit (AAF) der Eier auf ihre hämagglutinierende Aktivität untersucht. Proben, die keine hämagglutinierende Aktivität zeigen, werden mindestens einer weiteren Eipassage unterzogen. Positiv reagierende Proben werden im HAH mittels spezifischen Antiseren auf eine APMV-1-spezifische Reaktivität geprüft und das Vorliegen bakterieller Hämagglutinine über eine entsprechende Untersuchung ausgeschlossen.

Für die definitive Diagnose ND ist die Bestimmung der Pathogenität des Isolats unerlässlich. Es stehen hierfür sowohl In-vivo- als auch In-vitro-Verfahren zur Verfügung. Eine Pathotypisierung in vivo ist durch Bestimmung der Mittleren Absterberate (Mean Death Time, MDT) oder des Intracerebralen bzw. Intravenösen Pathogenitätsindex (ICPI, IVPI) möglich (Kaleta, 1992; Alexander & Senne, 2008). Die MDT gibt die Zeit an, nach der mit dem zu untersuchenden Isolat inokulierte Hühnerembryonen absterben. Der ICPI und der IVPI errechnen sich am Ende eines, unter standardisierten Bedingungen (Virusdosis, Alter und Zahl der Tiere, Beobachtungszeitraum von 10 Tagen) durchgeführten Tierversuchs aus einem

Punktescore, der durch Quantifizierung der klinischen Symptome erstellt wird. Aktuell basiert eine definitive Bestimmung der Virulenz nach der Richtlinie 92/66/EWG auf der Ermittlung des ICPI, da dieser Index die sichersten Aussagen bezüglich der Pathogenität ermöglicht. Laut Definition gilt als ND eine Infektion mit einem APMV-1-Stamm, der in eintägigen Hühnerküken einen ICPI von $\geq 0,7$ aufweist.

Da alle In-vivo-Verfahren relativ zeitaufwändig sind, gewinnen molekularbiologische Methoden, wie die Polymerasekettenreaktion (PCR), für Virusnachweis und -typisierung immer mehr an Bedeutung (Aldous & Alexander, 2001). Mit der Sondenhybridisierung (Oberdörfer & Werner, 1998; Aldous *et al.*, 2001) oder der Restriktionsenzymanalyse (Ballagi-Pordány *et al.*, 1996; Wehmann *et al.*, 1997) stehen mittlerweile brauchbare Methoden zur Charakterisierung von APMV-1-Stämmen zur Verfügung. Die Sequenzierung des PCR-Produktes ermöglicht des Weiteren eine phylogenetische Einordnung bzw. über die Analyse der Spaltstellensequenz des F-Proteins eine Bestimmung des Pathotyps (Collins *et al.*, 1993; Heckert *et al.*, 1996; King & Seal, 1998). Nach der Definition des O.I.E. (2008) ist zur Pathotypisierung der APMV-1 neben der Bestimmung des ICPI auch die Untersuchung der Spaltstelle des F-Proteins geeignet. Für Hühner virulente APMV-1 weisen mindestens ein Paar basischer Aminosäuren an Position 115 und 116, Phenylalanin an Position 117 sowie eine basische Aminosäure an Position 113 dieses Proteins auf. Es ist jedoch zu beachten, dass ein negatives PCR-Ergebnis bzw. das Fehlen eines multibasischen Spaltstellenmotivs eine Infektion mit virulenten APMV-1 nicht sicher ausschließen kann, da methodische Fehler sowie das Vorliegen einer gemischten Population avirulenter und virulenter Viren das Ergebnis verfälschen können. In diesem Fall muss auch hier eine Virusisolation mit anschließender In-vivo-Bestimmung der Virulenz erfolgen.

2.4.2 Antikörpernachweis

Der indirekte Nachweis von APMV-1-Infektionen, über die Detektion spezifische Antikörper, ist das zweite Standbein der APMV-1-Diagnostik. Er ist unerlässlich zur Überwachung des Infektions- bzw. Immunstatus einer Herde, zur Kontrolle des Immunisierungserfolges nach Vakzination sowie im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen. Der aktuell vom O.I.E. (2008) und der EU (Richtlinie 92/66/EWG) empfohlene Test ist der Hämagglutinations-

hemmungstest (HAH). Daneben gibt es, insbesondere für Hühnervögel, eine große Auswahl kommerzieller ELISAs, die nach den Vorgaben der Hersteller durchgeführt und durch das nationale Referenzlabor überwacht werden sollten. Von den zahlreichen anderen serologischen Verfahren kommt noch relativ häufig der Virusneutralisationstest im embryonierten Hühnerei bzw. in Zellkulturen (Kaleta, 1992) sowie für spezielle Fragestellungen der Immunfluoreszenztest (Mayr *et al.*, 1977) zum Einsatz. Probenmaterial für indirekte Nachweisverfahren ist in der Regel Blutserum (Richtlinie 92/66/EWG).

2.5 Methoden zum Nachweis humoraler Antikörper beim Wassergeflügel

2.5.1 Hämagglutinationshemmungstest

2.5.1.1 Testprinzip

Einige Viren haben die Fähigkeit, rote Blutkörperchen bestimmter Tierarten zu agglutinieren. Dieses als Hämagglutination bezeichnete Phänomen beruht, wie in Abschnitt 2.1.3 für Paramyxoviren beschrieben, auf der Fähigkeit bestimmter viraler Proteine, an antigene Determinanten (z.B. neuraminsäurehaltige Rezeptoren) auf der Oberfläche dieser Zellen zu binden. Über den Hämagglutinationstest können diese Viren somit in Probenmaterial detektiert bzw. durch Titration desselben in gewissem Umfang sogar mengenmäßig erfasst werden (Miller *et al.*, 1991).

Spezifisch gegen die zur Hämagglutination fähigen Proteine gerichtete Antikörper können dagegen, durch Besetzung der involvierten Bindungsstellen, eine Anlagerung der Viren bzw. ihrer Proteine an die Rezeptoren der Erythrozyten unterbinden und damit eine Hämagglutination verhindern (Burnet, 1942). Diese Fähigkeit wird im Hämagglutinationshemmungstest (HAH) diagnostisch genutzt (Abbildung 1). Mit seiner Hilfe können Serum, Dotter und Zerebrospinalflüssigkeit qualitativ und semiquantitativ auf entsprechende Antikörper untersucht werden. Im Falle der Paramyxoviren sind diese spezifisch gegen Epitope des HN-Moleküls gerichtet. Es werden Immunglobuline der Klassen M, G und A erfasst (Kaleta, 1992).

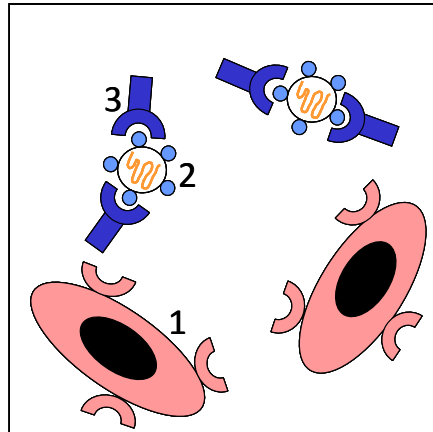


Abbildung 1. Testprinzip des HAH. Das Indikatorsystem des HAH sind die Erythrozyten (1). Enthält das Testserum spezifische, gegen hämagglutinierende virale Proteine (2) gerichtete Antikörper (3), so verhindern diese eine Agglutination der Erythrozyten.

2.5.1.2 Testverfahren und Durchführung

Für die Antikörperbestimmung über den HAH wurden beim Geflügel zwei Testverfahren, die Alpha- (konstante Serum-, variable Virusmenge) und die Beta-Methode (variable Serum-, konstante Virusmenge) entwickelt. Heute kommt in der Regel letztere zum Einsatz (Mayr *et al.*, 1977). Der in seinen Anfängen mit verhältnismäßig großen Volumina durchgeführte und methodisch häufig variierte Test ist im Laufe der Zeit, durch Übertragung ins Mikrotiterplattenformat (Allan & Gough, 1974) und zunehmende Standardisierung der Testbedingungen und Reaktionskomponenten (Temperatur, pH-Wert, Verdünnungspuffer, Erythrozytenmenge, Volumen etc.), auf die parallele Testung größerer Probenzahlen ausgerichtet worden. Eine aktuelle Vorschrift zur Durchführung des HAH bietet das Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals der O.I.E. (2008). Die zu untersuchende Probe wird in einer Zweierverdünnungsreihe titriert und 0,025 ml jeder Verdünnung anschließend mit dem gleichen Volumen einer konstanten Menge APMV-1-Antigen inkubiert. Nach den aktuellen Vorgaben des O.I.E. soll das pro Serumverdünnung eingesetzte Antigenvolumen 4 Hämagglutinierende Einheiten enthalten und somit, ohne Serumzusatz, bei einer Verdünnung von 1:4 gerade noch eine Agglutination bewirken (HA-Titer von 4). Zu dem Serum-Antigen-Gemisch werden daraufhin 0,025 ml einer 1%igen

Erythrozytenlösung, in der Regel Hühnererythrozyten, gegeben und erneut inkubiert. Je nachdem, ob und wie viele spezifische Antikörper im Testserum enthalten sind, kommt es bis zu einer gewissen Verdünnungsstufe zur Hemmung der Hämagglutination. Dies zeigt sich als Absinken der Erythrozyten auf den Röhrchenboden und zungenförmiges Auslaufen beim Schiefhalten des Gefäßes, wohingegen es im Falle einer Agglutination zur Bildung netzartiger Aggregate kommt, die sich auch beim Schräghalten des Gefäßes nicht in ihrer Struktur verändern (Mayr *et al.*, 1977). Der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe, bei der es gerade noch zu einer vollständigen Hemmung der Agglutination kommt, ist als HAH-Titer definiert. Letzterer steht in direkter Korrelation zur Konzentration von Antikörpern in der Probe (Mayr *et al.*, 1977). Das heißt je mehr Antikörper in der Probe enthalten sind, desto höher ist der Grad der Verdünnung, bei dem noch eine Hemmung der Agglutination stattfindet und desto höher ist damit auch der HAH-Titer.

2.5.1.3 Testeigenschaften

Aufgrund seines einfachen aber gleichzeitig effektiven Indikatorsystems, den Erythrozyten, zeichnet sich der HAH durch eine sowohl schnelle als auch einfache Durchführbarkeit sowie eine leichte Standardisierbarkeit der Testbedingungen aus. Speziespezifische Antikörper werden nicht benötigt. Im gleichen Testansatz und mit den gleichen Testkomponenten können so Seren der verschiedensten Vogelarten untersucht werden. Seine Sensitivität und Spezifität sind verhältnismäßig hoch. Noch dazu ist die Durchführung des HAH relativ billig (Murphy *et al.*, 1999). In Abhängigkeit von dem Zustand des Testserums ist über den HAH, sofern geeignete Referenzantigene zur Verfügung stehen, zudem eine Serotypisierung möglich. Aus arbeitstechnischen Gründen sind allerdings die Kapazitäten des HAH, was die Probenzahl betrifft, trotz der Übertragung auf das Mikrotiterplattenformat relativ begrenzt. Da seine Auswertung mit bloßem Auge erfolgt, muss trotz standardisierter Beurteilungskriterien außerdem mit einer gewissen Subjektivität der Ergebnisse gerechnet werden. Die als Indikatorsystem dienenden Erythrozyten unterliegen einem natürlichen Alterungsprozess, was eine gewisse Variabilität der Ergebnisse mit sich bringt und ihren regelmäßigen Austausch erforderlich macht. Ein Problem bei der Auswertung und

Interpretation der Testergebnisse stellen zudem in Serum oder infiziertem Gewebe enthaltene, unspezifisch reagierende Faktoren dar (Mayr *et al.*, 1977; s. Abschnitt 2.5.1.4).

2.5.1.4 Unspezifisch reagierende Faktoren

Unspezifisch reagierende Faktoren sind hochmolekulare Verbindungen unterschiedlicher chemischer Natur, die serologische Reaktionen verstärken, stören oder hemmen können. Im Falle des HAH spielen zum einen Faktoren eine Rolle, die eine unspezifische Hämagglutination bewirken (unspezifische Agglutinine, Isoagglutinine, Hämagglutinine) und zum anderen solche, die die Hämagglutination unspezifisch hemmen (Inhibitoren) bzw. die spezifische Hämagglutinationshemmung fördern (Cofaktoren) (Mayr *et al.*, 1977).

Hämagglutinine kommen ubiquitär, unter anderem auch im Serum vor. Sie haben wie der Name schon sagt die Fähigkeit, an Rezeptoren auf der Oberfläche von roten Blutkörperchen zu binden und somit deren Agglutination zu bewirken, weshalb sie im HAH falsch negative Ergebnisse bzw. abgeschwächte HAH-Titer hervorrufen können (Alexander, 1988b; Swayne & Halvorson, 2008). Um ihr Vorhandensein in Testseren auszuschließen, sollte für jedes im HAH untersuchte Serum eine Serumkontrolle mitgeführt werden, bei der die niedrigste eingesetzte Serumverdünnung ohne Zugabe von Antigen mit der Erythrozytensuspension inkubiert wird. Die Entfernung der unspezifischen Agglutinine aus dem Serum ist durch dessen Behandlung mit Erythrozyten derjenigen Tierart, von der auch die später im HAH-Test verwendeten Erythrozyten stammen, möglich (Mayr *et al.*, 1977). Das Problem ist außerdem zu umgehen, wenn Erythrozyten der zu testenden Tierart im HAH verwendet werden (Swayne & Halvorson, 2008).

Bei den, die Hämagglutinationshemmung fördernden Cofaktoren handelt es sich meist um Teile des Komplementsystems (Reno & Hoffmann, 1972). Durch Immunkomplexe, genauer genommen an Antigen gebundene Antikörper, wird die erste Komplementkomponente aktiviert, was eine kaskadenartige Reaktionsfolge auslöst, an deren Ende in der Regel die Zerstörung der Viren steht. Styk (1965) vermutet, dass durch Cofaktoren die Dissoziierbarkeit der Immunkomplexe vermindert und damit die Hemmreaktion

beschleunigt wird. Im Serum enthaltene Komponenten des Komplementsystems können durch Erhitzung (56°C für 30 Minuten) oder längere Lagerung bei 4°C inaktiviert werden (Mayr *et al.*, 1977).

Im Unterschied zu den Cofaktoren entfalten die unspezifischen Inhibitoren ihre Wirkung auch ohne Anwesenheit von Immunkomplexen bzw. spezifischen Antikörpern. Sie sind häufig mit Lipiden und Polysacchariden assoziiert. Art und Vorkommen der Inhibitoren variieren sowohl tierartbedingt als auch individuell. Je nach Art reagieren die Inhibitoren bevorzugt mit bestimmten Virusarten oder sogar Virusstämmen. Sie besetzen Rezeptoren auf der Oberfläche der Viren, sodass diese nicht mehr fähig sind rote Blutkörperchen zu agglutinieren. Auf diese Weise kommt es zur Vortäuschung positiver HAH-Titer bzw. zur Verstärkung einer bereits vorhandenen spezifischen Hämagglutinationshemmung, d.h. zu vermeintlich höheren HAH-Titern (Mayr *et al.*, 1977). Die Inaktivierung bzw. Entfernung dieser unspezifischen Faktoren erfordert z.T. sehr zeitaufwändige Vorbehandlungen. Während für die meisten thermolabilen Inhibitoren eine Erhitzung des Serums auf 56°C für 30 Minuten ausreicht, sind im Falle der thermostabilen Faktoren Behandlungen mit verschiedenen Substanzen, wie dem „Receptor destroying enzyme“ (RDE) (Tyrrell & Horsfall, 1952), Kaliumperjodat, Manganchlorid-Heparin, Trypsin oder Kaolin notwendig (Mayr *et al.*, 1977). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass einige dieser Behandlungen jedoch auch zu einer Reduktion der spezifischen Antikörperspiegel führen (Mann *et al.*, 1967; Swayne & Halvorson, 2008).

2.5.2 Enzyme-linked immunosorbent assay

2.5.2.1 Testprinzip

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gehört als Enzymimmunassay (EIA) zusammen mit Radioimmunassay (RIA) und Präzipitationsimmunassay (PIA) zur großen Gruppe der Immunassays und zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus. Die Ursprünge des EIA gehen in die frühen 1970er Jahre zurück, in denen sein Testprinzip parallel von Wissenschaftlern in Frankreich (Avrameas & Guilbert, 1971) und Schweden

(Engvall & Perlman, 1971) erarbeitet wurde. Das Prinzip des ELISA beruht wie das aller Immunassays auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit anschließender Detektion der Immunkomplexe (Hudson & Hay, 1989). Grundlage hierfür ist die Fähigkeit der Antikörper, mit ihrem Paratop spezifisch an das entsprechende Epitop des passenden Antigens zu binden (Luttmann *et al.*, 2006). Die dabei wirksamen Bindungsarten sind Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen sowie van-der-Waals-Kräfte. Es handelt sich um eine Gleichgewichtsreaktion, wobei die Gleichgewichtskonstante, d.h. die Geschwindigkeit, mit der sich das Gleichgewicht einstellt, in hohem Maße temperaturabhängig ist. Je höher die Temperatur ist, desto schneller stellt sich das Gleichgewicht ein. Die Stabilität der entstehenden Immunkomplexe wird durch die Kraft der Bindung zwischen dem einzelnen Paratop und dem entsprechenden Epitop (Affinität) sowie bei multivalenten Bindungen zusätzlich durch die Gesamtheit der Affinitäten in einem Immunkomplex (Avidität) bestimmt. Affinität und Avidität der Bindungspartner haben wesentlichen Einfluss auf die spätere Sensitivität des Tests (Luttmann *et al.*, 2006). Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt beim EIA über an Antikörper gebundene Enzyme, die durch den Umsatz entsprechender Substrate einen mit bloßem Auge sichtbaren Farbumschlag bewirken oder photometrisch detektierbare lösliche Endprodukte erzeugen. Vorarbeit leistete hier unter anderem Avrameas (1969a,b), der Untersuchungen zur Kopplung von Enzymen an Antikörper durchführte. Die Verwendung von Enzymen anstelle radioaktiver Substanzen zur Markierung der Antigen-Antikörper-Reaktionen machte die Durchführung des EIA wesentlich harmloser und einfacher als die des RIA. Enzyme sind zudem billiger, haltbarer sowie leichter und auf vielfältigere Weise detektierbar als radioaktive Stoffe (Miller *et al.*, 1991). Von großem Vorteil erweist sich außerdem die Enzymen eigene Fähigkeit, größere Mengen an Substrat umzusetzen, ohne selbst in der Reaktion verbraucht zu werden (Miller *et al.*, 1991).

Diese Vorzüge sowie die ständig gewachsene Auswahl an Puffern, Reaktionskomponenten, Testregimen, Auswertungsverfahren und -instrumenten (O'Beirne & Sever, 1992) brachten einen enormen Gewinn an Flexibilität mit sich, so dass der EIA traditionelle Immunassays wie den RIA bereits seit langer Zeit ersetzt. Der ELISA ist heute der am häufigsten angewandte quantitative Immunassay (Luttmann *et al.*, 2006). In seinen unterschiedlichen Varianten wird er auch immer häufiger zum Nachweis von Antikörpern im Serum von Wassergeflügel,

insbesondere im Rahmen größerer Überwachungsprogramme genutzt (Tabelle 6, Abschnitt 2.8).

2.5.2.2 Testverfahren und Durchführung

Innerhalb der Gruppe der EIAs unterscheidet man zwischen homogenen und heterogenen Testverfahren. Der ELISA gehört zu den heterogenen EIAs, wobei hier die Reaktion im Unterschied zu den homogenen EIAs nicht vollständig in Lösung stattfindet, sondern ein Reaktionspartner (Antigen oder Antikörper) gewöhnlich an eine feste Phase (Matrix) gebunden ist (Miller *et al.*, 1991). Verschiedenste Materialien, wie speziell beschichtete Perlen, Röhrchen und Küvetten wurden bereits erprobt (O'Beirne und Sever, 1992). Für die sogenannten DOT-Immunassays wird das Antigen in Form kleiner Tropfen auf Nitrozellulosemembranen aufgetragen (Hawkes *et al.*, 1982). Bei den modernen ELISAs kommen in der Regel beschichtete Mikrotiterplatten aus Polystyrol zum Einsatz (Luttmann *et al.*, 2006). Das Testprinzip der heterogenen EIAs erfordert weiterhin die Durchführung von Waschschritten nach den einzelnen Inkubationsphasen, um nicht gebundene Reagenten, die zu verfälschten Ergebnissen führen würden, möglichst vollständig zu entfernen (Miller *et al.*, 1991). Der erste Waschschrift erfolgt bereits nach der Adsorption des bekannten Reaktionspartners an die Matrix.

Nach ihrem Aufbau kann man die aktuell in der Diagnostik verwendeten ELISAs zum Nachweis von Antikörpern in zwei Kategorien unterteilen: indirekte ELISAs und kompetitive ELISAs (Abbildung 2).

In der Regel wird bei beiden Testvarianten in einem ersten Schritt das zu den gesuchten Antikörpern passende Antigen passiv (elektrostatisch) an entsprechend beschichtete Mikrotiterplatten adsorbiert. Das Antigen wird dazu in „Coating“-Puffer (Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 bzw. PBS pH 7,4) verdünnt und über Nacht auf die Platten gegeben. Um eine möglichst hohe Sensitivität bei geringer Hintergrundreaktivität zu erzielen, sollte das Antigen in möglichst reiner Form vorliegen und seine Einsatzkonzentration sorgfältig ausgewählt werden. Empfohlen werden Konzentrationen von 0,5 bis 10,0 µg Antigen pro ml „Coating“-Puffer (Luttmann *et al.*, 2006). Zur Verhinderung unspezifischer Reaktionen müssen nicht gebundene Antigenmoleküle nach der Inkubation

durch Waschen und gutes Ausklopfen der Platten entfernt sowie nicht von Antigen besetzte Bindungsstellen auf der Platte im Anschluss geblockt werden. Als Waschpuffer wird in der Regel PBS mit 0,05 bis 0,1% Tween20 eingesetzt. Zum Blocken wird dieser mit Bovinem Serumalbumin (BSA), Fetalem Kälberserum (FKS), Casein, Gelatine oder einfachem Milchpulver versetzt (Luttmann *et al.*, 2006).

In den hierauf folgenden Schritten bestehen jedoch Unterschiede zwischen den beiden ELISA-Methoden (Miller *et al.*, 1991; Luttmann *et al.*, 2006).

Beim indirekten ELISA (Abbildung 2A) folgt nun die Inkubation mit der zu untersuchenden Serumprobe. Enthält die Probe spezifische, gegen das Antigen auf der Platte gerichtete Antikörper, so kommt es zur Bildung von Immunkomplexen. Diese werden, nach Entfernung freier Reagenten über einen Waschschrift, mit einem enzymmarkierten sekundären Antikörper (Konjugat) detektiert. Letzterer muss speziesspezifisch sein, das heißt spezifisch Serum-Igs derjenigen Tierart identifizieren, von der das Testserum stammt. Nach einem erneuten Waschschrift wird ein passendes Substrat zugegeben, dessen Umsetzung durch das konjugierte Enzym einen Farbumschlag (Fluoreszenz, Chemilumineszenz) bewirkt, der photometrisch gemessen und anschließend quantifiziert werden kann. Die Stärke der enzymatischen Aktivität wird direkt beeinflusst durch die Affinität der gesuchten Antikörper zum Antigen einerseits und durch die Konzentration der Antikörper andererseits (Butler *et al.*, 1978).

Die kompetitiven oder „blocking“ ELISAs (cELISA) beruhen dagegen auf dem Konkurrenzprinzip (Abbildung 2B). Gleichzeitig oder im Anschluss an das Testserum wird ein enzymmarkierter Antikörper im Überschuss zugegeben, der mit den gesuchten Antikörpern um die limitierten Bindungsstellen des auf der Platte adsorbierten Reaktionspartners konkurriert. Das heißt, je höher die Affinität bzw. die Konzentration der gesuchten Antikörper ist, desto weniger Konjugat kann an den Reaktionspartner auf der Platte binden und im Anschluss eine photometrisch messbare Reaktion bewirken. Die Stärke der, nach Zugabe eines passenden Substrates gemessenen enzymatischen Aktivität steht bei dieser ELISA-Variante in inversem Verhältnis zu der Affinität bzw. zur Konzentration spezifischer Antikörper in der Probe.

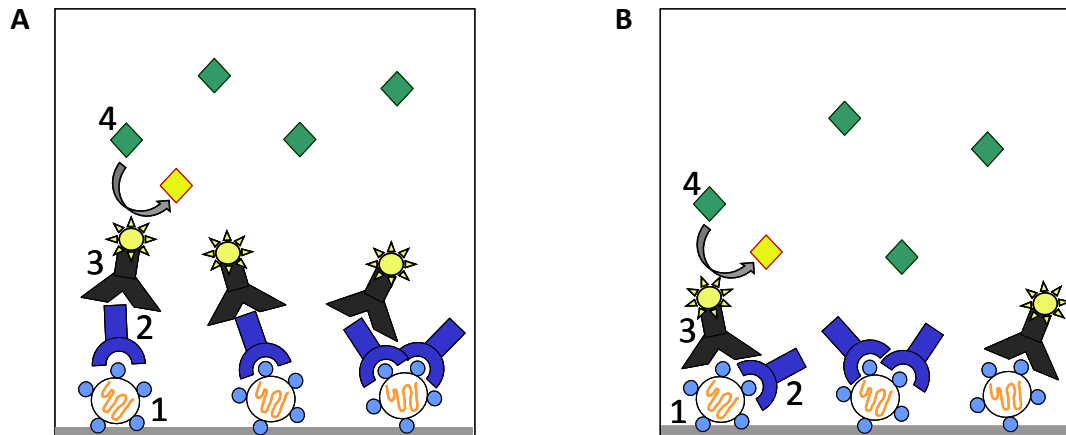


Abbildung 2. Testprinzip des indirekten bzw. kompetitiven ELISA. Beim indirekten ELISA (A) werden spezifisch an virale Proteine (1) bindende Antikörper im Testserum (2) über einen enzymmarkierten, Substrat (4) umsetzenden Antikörper (3) sichtbar gemacht. Beim kompetitiven ELISA (B) konkurrieren die enzymmarkierten Antikörper (3) mit im Testserum enthaltenen virusspezifischen Antikörpern (2) um die Bindungsstellen.

Für die Herstellung der Konjugate stehen mehrere Enzyme zur Verfügung (Tabelle 4), die in ihrem pH-Optimum differieren und sich unterschiedlich leicht an Antikörper koppeln lassen. In der Regel kommen Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) oder Alkalische Phosphatase (AP), seltener β -Galaktosidase bzw. Glucoseoxidase (GOX) zum Einsatz. Bei den Substraten handelt es sich um Substanzen, die nach enzymatischer Umsetzung colorimetrisch (chromogenes Substrat), fluorimetrisch bzw. luminometrisch erfasst werden können. Chromogene Substrate haben den Vorteil, dass ihre farbigen Produkte relativ lange stabil sind und die Auswertung gegebenenfalls mit bloßem Auge oder aber mit relativ günstigen Photometern erfolgen kann. Mit fluorimetrisch oder luminometrisch nachweisbaren Substraten wird in der Regel eine höhere Sensitivität erzielt, ihr Nachweis erfordert jedoch speziellere Photometer und die Reaktionsprodukte sind sehr viel kurzlebiger (Luttmann *et al.*, 2006). Je nach gewähltem Substrat kann es zur Vermeidung von dessen Degradierung von Vorteil sein, die enzymatische Umsetzung unter Lichtausschluss ablaufen zu lassen (O'Beirne & Sever, 1992). Während bei homogenen EIAs die Messung der Reaktivität ratenweise im Abstand bestimmter Zeitintervalle erfolgt, wird bei heterogenen EIAs in der Regel eine Endpunktmessung durchgeführt (Miller *et al.*, 1991). Dazu wird der

enzymatische Vorgang kurz vor der photometrischen Messung mit einer, dem jeweiligen Substrat entsprechenden Stopplösung zum Stillstand gebracht (Tabelle 4). Die Messung der Reaktivität erfolgt in Form der optischen Dichte (OD, Extinktion) mittels Spektrophotometern oder Colorimetern unter Verwendung einer, für das jeweilige enzymatische Endprodukt geeigneten Messwellenlänge (Tabelle 4).

Tabelle 4. Enzyme, Substrate, Stopplösungen und Messwellenlängen für den ELISA (modifiziert nach Luttmann *et al.*, 2006)

Enzym	pH Optimum	Substrat	Nachweisgrenze von Enzym-markiertem IgG [ng/ml]	Stopplösung	Messwellenlänge
Meerrettich-peroxidase	5 - 7	ABTS/H ₂ O ₂ (c)	16,0	1 M Zitronensäure + 0,05 % NaN ₃	405 nm
		<i>o</i> PD/H ₂ O ₂ (c)	2,0	2,5 M H ₂ SO ₄	490 nm
		TMB/H ₂ O ₂ (c)	0,3	2,0 M H ₂ SO ₄	370 nm (ohne Stopplösung) 450 nm (nach Zugabe von H ₂ SO ₄)
		HPPA/H ₂ O ₂ (f)	0,3		
Alkalische Phosphatase	9 - 10	<i>p</i> NPP (c) MUP (f)	43,0 0,5	3 M NaOH	405 nm
β -Galaktosidase	6 - 8	<i>o</i> NPG (c) MUG (f)	350,0 1,0	1 M Na ₂ CO ₃	405 nm
Glucoseoxidase	4 - 7	mit Peroxidase gekoppelte Reaktion; Zugabe von Glucose, Peroxidase und Substrat für die Peroxidase			

(c) bzw. (f) = chromogenes bzw. fluorimetrisch nachweisbares Substrat

ABTS = 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat

HPPA = 3-(*p*-Hydroxyphenyl)-propionsäure

MUG = 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktopyranosid

MUP = 4-Methylumbelliferylphosphat

o NPG = *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid

o PD = *o*-Phenylendiamin

p NPP = *p*-Nitrophenylphosphat

TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

2.5.2.3 Auswertung

Der ELISA ermöglicht einerseits eine qualitative Aussage über die An- bzw. Abwesenheit von Antikörpern, andererseits ist je nach Testaufbau in gewissem Umfang auch eine semiquantitative bzw. quantitative Auswertung der Ergebnisse möglich (Miller *et al.*, 1991). Sowohl die semiquantitative als auch die quantitative Beurteilung des Antikörpergehalts erfordern die Titration der Probe. Für die quantitative Bestimmung des Antikörpergehalts muss zusätzlich ein Standardserum mit bekannter Antikörperkonzentration in verschiedenen Verdünnungen mitgeführt werden. Dies dient zur Erstellung einer Dosis-Antwort-Kurve (Kalibrierungskurve), mit deren Hilfe von der Intensität der optischen Extinktion auf die Antikörperkonzentration in der Probe geschlossen werden kann (Miller *et al.*, 1991). Um die relativ zeit- und kostenintensive Titration zu umgehen wurden Versuche unternommen, ELISAs zu etablieren, die eine semiquantitative Auswertung über die Testung der Proben in nur einer Verdünnung ermöglichen. Snyder und Mitautoren (1983) entwickelten als Erste das Prinzip eines sogenannten „single-serum-dilution“-ELISA. Diese Arbeitsgruppe verwendete im Grunde die aus einer Regressionsanalyse positiver Referenzseren erhaltene Regressionsgleichung, um aus der für eine Probe gemessenen Extinktion den zugehörigen Titerwert zu errechnen.

Genau genommen ist aber mittels ELISA eine quantitative Antikörperbestimmung im engeren Sinne nicht möglich, da die gemessene Enzymaktivität nicht nur von der Konzentration der Antikörper, sondern auch von deren Affinität zum Antigen beeinflusst wird (Butler *et al.*, 1978). Die genaueste Aussage über den Antikörpergehalt einer Probe liefert immer noch die Titration, da die Antikörperaffinität mit steigender Verdünnung an Bedeutung verliert.

Um den Einfluss der Hintergrundreaktivität zu vermindern und Vergleiche zwischen Tests zu erleichtern, werden in der Regel nicht die Rohdaten zur Auswertung herangezogen, sondern in Relation zu Positiv- und Negativkontrolle gesetzte Werte. Ein mögliches Verfahren beim indirekten ELISA ist die Bestimmung der s/p-Ratio (Errington *et al.*, 1995). Dazu wird der durch Abzug der Negativkontrolle korrigierte Wert der Probe durch den, auf die gleiche Weise korrigierten Wert der Positivkontrolle geteilt. Im Falle des kompetitiven ELISA wird aus den Rohdaten die, durch die Probe verursachte prozentuale Inhibition des testinternen Konjugats bestimmt. Dazu wird als Erstes für jede Probe die prozentuale Restreaktivität des

testinternen Konjugats berechnet. Dies geschieht durch die Division des für die Probe gemessenen Extinktionswertes durch den Extinktionswert der Negativkontrolle mal 100, ausgehend von der Annahme, dass die Restreaktivität des Konjugats im Falle der Negativkontrolle 100% betragen muss. Zum Erhalt des Wertes der prozentualen Inhibition wird die prozentuale Restreaktivität im Anschluss von 100 subtrahiert.

Egal, ob eine qualitative oder quantitative Aussage gemacht werden soll, ist zur Bewertung der Ergebnisse als positiv oder negativ die Definition eines Grenzwertes (Cutoff, Entscheidungsgrenze) bzw. eines Grenzwertbereiches unerlässlich. Während der Cutoff eine klare Grenze zwischen positiven und negativen Messwerten zieht, handelt es sich beim Cutoff-Bereich um einen, zwischen positiven und negativen Werten liegenden Ergebnisraum, in den nicht eindeutig als positiv oder negativ zu beurteilende Werte fallen. Die Bestimmung des Cutoffs bzw. Cutoff-Bereiches kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. In der Regel wird der Mittelwert plus die zweifache Standardabweichung der Extinktionen einer größeren Zahl negativer Seren als Cutoff verwendet (Greiner *et al.*, 1995). Eine Steigerung der Testspezifität kann durch die Verwendung der dreifachen Standardabweichung erzielt werden (Luttmann *et al.*, 2006). Aufwändigere graphische Verfahren zur Bestimmung des Cutoffbereichs sind die „receiver operating characteristic“(ROC)-Analyse (Zweig & Campbell, 1993) sowie die „two graph“(TG)-ROC-Analyse (Greiner *et al.*, 1995). Beide Methoden machen es möglich, über die Wahl des Grenzwertbereiches, die Sensitivität und Spezifität eines Tests innerhalb testbedingter Grenzen den jeweiligen Erfordernissen anzupassen.

2.5.2.4 Testeigenschaften sowie Wahl des Assaykonzepts

Einige Vorteile des ELISAs wurden bereits in Abschnitt 2.5.2.1 erwähnt. Weitere positive Eigenschaften sind der hohe Grad seiner Automatisierbarkeit, was Durchführung und Auswertung betrifft, und der im Vergleich zu anderen Tests wie IF-Test, Neutralisationstest und HAH hohe Probendurchsatz (Alexander, 1988b). Zudem zeichnet sich der ELISA durch eine vergleichsweise hohe Sensitivität und Spezifität aus (Murphy *et al.*, 1999). Der Test ist somit ideal zur schnellen Auswertung großer Probenmengen im Rahmen von „Screening“-Untersuchungen oder „Monitoring“-Programmen geeignet.

Er stellt jedoch im Vergleich zu anderen Tests, wie dem HAH, höhere Anforderungen an die Reinheit der verwendeten Antigene. Mit unsauberem Virusmaterial beschichtete Platten, oder Testseren von schlechter Qualität, können zu unspezifischen Reaktionen führen. Die Enzyme sind zudem relativ anfällig gegenüber variablen Umweltbedingungen, insbesondere Temperaturschwankungen. Technische Probleme, wie Funktionsstörungen der Geräte, müssen bei unstimmgigen Testergebnissen ebenfalls beachtet werden. Eine regelmäßige gewissenhafte Qualitätskontrolle ist somit auch beim ELISA unerlässlich (Miller *et al.*, 1991).

2.5.3 Indirekter Immunfluoreszenz-Test

2.5.3.1 Testprinzip

Bestimmte Substanzen, sogenannte Fluorochrome, können durch Bestrahlung mit kurzwelligem Licht definierter Wellenlänge angeregt werden. Dabei werden, durch Absorption dieser hochenergetischen Lichtstrahlen, Elektronen der Fluorochrom-Moleküle in einen energetisch höheren Zustand gehoben, aus dem sie unter Wiederabgabe der Energie in ihren stabileren Grundzustand zurückfallen. Die freiwerdende Energie ist als farbiges Licht sichtbar. Da dieses nur während der Bestrahlungsdauer emittiert wird, spricht man hier von Fluoreszenz (Mayr *et al.*, 1977).

Koppelt man Fluorochrome an Antikörper, können mit ihrer Hilfe die dazugehörigen Antigene detektiert werden. Dieses Prinzip machten sich erstmals Coons *et al.* (1942) zunutze, um Pneumokokken nachzuweisen. Es folgten zahlreiche Verbesserungen der Methode und schließlich auch die Anwendung des Immunfluoreszenztests (IF-Test) in der Virologie. Einen großen Fortschritt brachte die Synthese des Fluorochroms Fluoresceinisothiocyanat (FITC) durch Riggs *et al.* (1958), da dieses stabiler ist und sich sehr leicht an Globuline koppeln lässt.

2.5.3.2 Testdurchführung

Beim indirekten IF-Test zum Nachweis von Antikörpern werden Zellen als Einschichtkulturen (Monolayer) in Kulturgefäßen oder auf Objektträgern angezüchtet und mit dem Virus, gegen das die zu suchenden Antikörper gerichtet sind, infiziert. Nach für eine Virusvermehrung ausreichender Inkubationszeit werden die Zellen fixiert. Als Fixierungsmittel finden z.B. Aceton, Tetrachlorkohlenstoff oder Formalin Verwendung (Mayr *et al.*, 1977). Dieser Schritt ist nötig, um die Zellmembran für Antikörper durchlässig zu machen und um die Infektiosität der Viren zu inaktivieren. Die fixierten Zellen werden gewaschen und anschließend mit dem Testserum inkubiert (Abbildung 3). Sind die gesuchten Antikörper in der Probe enthalten, kommt es zur Bildung von Immunkomplexen. Nach einem erneuten Waschschrift, zur Entfernung ungebundener Reagenten, werden fluorochromkonjugierte Antikörper hinzugegeben, die spezifisch gegen das IgG derjenigen Spezies gerichtet sind, deren Serum untersucht wird. Nach definierter Inkubationszeit und folgendem Waschschrift werden die Zellen mit Deckmedium überschichtet und im Falle von Objektträgern zusätzlich mit einem Deckglas abgedeckt. Als Deckmedium dient ein Glycerin-Puffer-Gemisch oder ein kommerzielles Eindeckelungsmedium. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von, für die Fluoreszenzmikroskopie umgebauten konventionellen Mikroskopen bzw. mittels speziell für diesen Zweck konzipierten Fluoreszenzmikroskopen. Allen gemeinsam sind eine spezielle Lichtquelle, die ultraviolettes Licht aussendet, sowie spezielle Filter, die nur die von dem verwendeten Fluorochrom ausgesandte Wellenlänge hindurch lassen (Murphy *et al.*, 1999). Die Dunkelfeldmikroskopie hat sich für die Immunfluoreszenz als sehr geeignet erwiesen, da mit ihr eine klarere Fluoreszenz und ein höherer Kontrast erreicht werden (Mayr *et al.*, 1977). Fluoreszenz tritt dort auf, wo sich in den infizierten Zellen virale Antigene befinden. Bei APMV-1 ist sie in der Regel im Zytoplasma lokalisiert (Mayr *et al.*, 1977). Granzow und Mitautoren (1999) beschrieben aber auch intranukleäre Einschlusskörperchen.

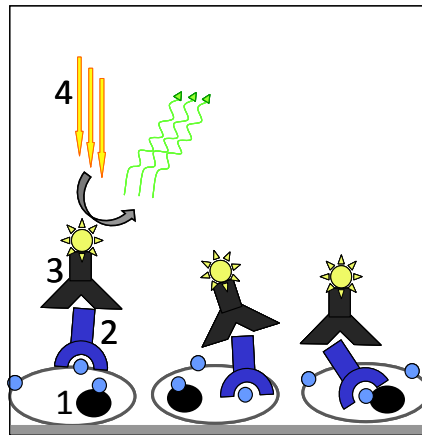


Abbildung 3. Testprinzip des indirekten IF-Tests. Die Reaktion im Testserum enthaltener spezifischer Antikörper (2) mit zellassozierten viralen Antigenen (1) wird über einen enzymmarkierten Antikörper (3), der bei Anregung durch Licht bestimmter Wellenlänge (4) ein Fluoreszenzsignal aussendet, sichtbar gemacht.

2.5.3.3 Testeigenschaften

Der IF-Test ist ein schnelles diagnostisches Verfahren, das bei ordnungsgemäßer Durchführung und geschulter Auswertung eine hohe Sensitivität aufweist. So ermöglicht dieser Test den Nachweis von Antikörpern, die mit anderen Methoden nur schwer oder überhaupt nicht detektierbar sind (Murphy *et al.*, 1999). Zudem ist er nicht, wie andere serologische Verfahren, auf zeitaufwändig herzustellendes, aufgereinigtes Antigen angewiesen. Da er von der Probenzahl her begrenzt ist, seine Auswertung verhältnismäßig subjektiv ist und die Interpretation häufig durch unspezifische Fluoreszenz erschwert wird, hat er in der Routinediagnostik heute zwar eine untergeordnete Bedeutung, wird aber gerne zur Klärung bestimmter Fragestellungen herangezogen (Kaleta, 1992).

2.5.4 Western Blot

2.5.4.1 Testprinzip

Neben dem Northern Blot und dem, nach seinem Erfinder E.M. Southern benannten Southern Blot, zum Nachweis von RNA bzw. DNA, existiert mit dem Western Blot (WB) ein drittes, auf dem gleichen Prinzip beruhendes Testverfahren, mit dem Proteine detektiert werden können. Bei allen drei Varianten wird die nachzuweisende Substanz auf eine Membran übertragen und anschließend über verschiedene Techniken visualisiert. Diese Techniken ermöglichen die Detektion sehr geringer Mengen der gesuchten Substanz, die auf der Membran dauerhaft fixiert ist (Luttmann *et al.*, 2006).

Bei Verwendung bekannter viraler Proteine ist der WB aber auch in der serologischen Diagnostik und Forschung zum Nachweis spezifischer Antikörper aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten einsetzbar.

2.5.4.2 Testdurchführung

In einem ersten Schritt wird bekanntes, in der Regel aufgereinigtes Virusmaterial elektrophoretisch über ein Gelsystem aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt nach Eigenladung (isoelektrische Fokussierung), nach Größe, Struktur und Ladung (native Polyacrylamid-Gelelektrophorese) bzw. nach dem Molekulargewicht der Proteine (Natrium(sodium)dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE). Letzteres Verfahren ist am gebräuchlichsten und wird in der Regel nach dem diskontinuierlichen SDS-PAGE-System nach Laemmli (1970) durchgeführt. Das in diesem Fall zur Herstellung der Gele eingesetzte Polyacrylamid ist ein Polymer, das aus zwei Komponenten (Acrylamidmonomeren und N,N'-Methylenbisacrylamid) besteht, die durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und Ammoniumpersulfat vernetzt werden können. Der Acrylamidgehalt entscheidet über die Größe der Maschen in diesem Netzwerk. Die aufzutrennenden Proteine werden vor dem Auftragen auf das Gel in Probenpuffer (z.B. β -Merkaptoethanol oder Dithiothreitol DTT) gekocht (5 Minuten bei 99°C), was über eine Reduktion der Disulfidbrücken zu ihrer vollständigen Denaturierung führt. Das im Gel

enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt als anionisches Detergens zudem die Lösung der, auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Bindungen in den Proteinen und überführt sie so in ihre lineare Primärstruktur. Da ihre Eigenladung durch die starke negative Ladung des SDS überdeckt wird, werden die Proteine bei Anlegen der Spannung allein nach ihrem Molekulargewicht in Richtung der Anode aufgetrennt. D.h., kleinere Proteine wandern schneller durch die Gelmaschen als große. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE erfolgt in einem vorgeschalteten Sammelgel eine Fokussierung der Proteine zu einer scharfen Bande, so dass sie alle nahezu gleichzeitig ins Trenngel einwandern. Dies verbessert die Abgrenzbarkeit der entstehenden Proteinbanden voneinander.

Als nächster Schritt folgt der eigentliche Blot auf Nitrozellulose-, Polyvinylidenfluorid(PVDF)- oder Nylon-Membranen. Bei den Transfermethoden existiert wiederum eine große Auswahl. Durchgesetzt haben sich elektrophoretische Blotverfahren, wie der Nass- und der Halbtrockenblot. Der Aufbau beider Systeme beruht auf dem Sandwichprinzip (Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier). Was Zeitaufwand, Pufferverbrauch und Proteinverträglichkeit anbelangt, unterscheiden sich die beiden Verfahren jedoch. Zur Kontrolle des Transfererfolges können die Proteine auf der Membran mit speziellen Farblösungen, wie dem roten Ponceau-S reversibel angefärbt werden.

Der nächste wichtige Schritt vor dem eigentlichen Immunoblot ist die Blockierung der nicht von Proteinen besetzten Membranabschnitte, zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundreaktivität und zur Erhöhung der Sensitivität. Als Blockpuffer können, wie beim ELISA, in Puffer gelöstes Magermilchpulver bzw. Bovines Serumalbumin oder aber anionische Detergentien eingesetzt werden. Als nächstes erfolgt die Inkubation der Membran mit der in Blockpuffer verdünnten Probe (Abbildung 4). In dieser enthaltene spezifische Antikörper binden an die entsprechenden Proteine auf der Membran. Von großer Wichtigkeit zur Vermeidung unspezifischer Reaktivität ist, wie beim ELISA, die Entfernung ungebundener Reagenten durch eine, auf jede Inkubation folgende Waschprozedur. In der Regel handelt es sich jeweils um drei mehrere Minuten dauernde Waschschrte. An letzter Stelle der Antikörperkaskade steht ein speziesspezifischer markierter Antikörper. In Abhängigkeit von dem, an diesen konjugierten Nachweisreagenz erfolgt die Visualisierung direkt (z.B. radioaktives oder fluoreszierendes Reagenz) oder indirekt (enzymatischer Substratumsatz), in der Regel durch Schwärzung eines Filmes oder über ein spezielles Dokumentationssystem. Die Visualisierung mit Hilfe von Enzymkonjugaten ist die Methode

der Wahl. Wie beim ELISA wird in der Regel Meerrettich-Peroxidase oder Alkalische Phosphatase mit den entsprechenden Substraten eingesetzt (Luttmann *et al.*, 2006).

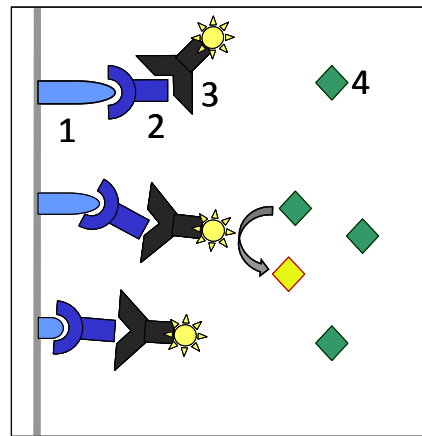


Abbildung 4. Testprinzip des WB. Im Testserum enthaltene Antikörper (2) binden an, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennte virale Proteine (1) und werden über enzymmarkierte, Substrat (4) umsetzende Antikörper (3) detektiert.

2.5.4.3 Testeigenschaften

Die Durchführung des Western Blots ist zeitintensiv, schwer zu automatisieren, relativ teuer und technisch anspruchsvoll. Mit seiner Hilfe können jedoch Reaktionen gegen spezifische virale Proteine sichtbar gemacht werden, was eine Differenzierung nicht nur zwischen spezifischen und unspezifischen serologischen Reaktionen, sondern auch zwischen Infektionen mit nahe verwandten Viren ermöglicht. Anhand des Antikörpermusters des Testserums ist es außerdem möglich, auf das Stadium der Infektion zu schließen. Zum Beispiel werden bei Infektionen mit Hepatitis-C-Viren anfangs nur Antikörper gegen Nichtstrukturproteine gebildet und erst zu einem späteren Zeitpunkt solche gegen die Strukturproteine (Netski *et al.*, 2005). Aufgrund seiner Eigenschaften, insbesondere seiner hohen Spezifität, wird der WB häufig als Bestätigungstest eingesetzt (Murphy *et al.*, 1999, Büttner, 2002, Luttmann *et al.*, 2006).

2.6 Beurteilung serologischer Tests

Ziel der Validierung eines Testsystems ist die Ermittlung seiner Funktionsfähigkeit und seiner Einsatzmöglichkeiten. Um einen Überblick über die Qualität eines Testverfahrens, das heißt die Genauigkeit und Verlässlichkeit seiner Ergebnisse zu erhalten, sind verschiedene Validierungsschritte erforderlich (Grotjan & Keel, 1996). Eine erste Beurteilung wird über die Bestimmung seiner Sensitivität und Spezifität ermöglicht. In der Folge kann die Richtigkeit der Ergebnisse durch einen Vergleich mit etablierten Referenzmethoden verifiziert sowie ihre Wiederholbarkeit überprüft werden. Am Ende des Validierungsprozesses steht die Erprobung der Eignung des etablierten Tests, die von ihm im Rahmen des vorgesehenen praktischen Einsatzes erwarteten Informationen zu liefern. Dies erfolgt durch Testung einer größeren Anzahl von, dem späteren Untersuchungsmaterial entsprechenden, wenn möglich durch einen anderen Test bereits definierten Proben.

2.6.1 Sensitivität und Spezifität

Die Fähigkeit, zwischen für eine gesuchte Substanz positiven und negativen Proben zu unterscheiden ist die Grundforderung, die an jedes Testverfahren gestellt wird. Den idealen Test, der eine absolut sichere Differenzierung erlaubt gibt es allerdings nicht, da falsche Beurteilungen in gewissem Umfang und aus unterschiedlichen Gründen bei jeder Methode auftreten können. Umso wichtiger ist deshalb die Ermittlung des Ausprägungsgrades dieser Fähigkeit. Die beiden statistischen Parameter, diagnostische Sensitivität (DSe) und diagnostische Spezifität (DSp), ermöglichen Aussagen über die Richtigkeit der mit einem bestimmten Test ermittelten Diagnosen (Miller *et al.*, 1991). Sie sollen also die Frage beantworten, inwiefern die Testergebnisse die Realität widerspiegeln. Im Falle von serologischen Tests ermöglichen sie eine Einschätzung der Fähigkeit des Tests, Proben von Tieren mit spezifischen Antikörpern von solchen ohne diese zu unterscheiden. Die diagnostische Sensitivität (DSe) gibt an, welcher Prozentsatz der getesteten, erkrankten bzw. infizierten Tiere mit Hilfe des Tests als positiv erkannt wird:

$$\text{DSe (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver Proben}}{\text{Anzahl richtig positiver plus Anzahl falsch negativer Proben}} \times 100$$

Die diagnostische Spezifität (DSp) steht dagegen für den Prozentsatz der getesteten gesunden Tiere, der im vorliegenden Test ein negatives Ergebnis liefert:

$$\text{DSp (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer Proben}}{\text{Anzahl richtig negativer plus Anzahl falsch positiver Proben}} \times 100$$

Über die DSe bzw. die DSp kann außerdem auf die Anzahl der, bei der vorherrschenden Prävalenz, als falsch negativ bzw. falsch positiv beurteilten Proben geschlossen werden (Miller *et al.*, 1991). Dies ermöglicht eventuell ein besseres Verständnis der Konsequenzen, die sich aus der ermittelten DSe und DSp ergeben. Bei einer DSe von 90 % werden z.B. 10 von 100 positiven Tieren falsch negativ bewertet und bei einer DSp von 90 % identifiziert der Test 10 von 100 negativen Tieren fälschlicherweise als positiv.

Voraussetzung für die Bestimmung der DSe und der DSp eines Tests ist die Bekanntheit des Status der Proben bzw. deren parallele Testung in einem anerkannten Referenztest. Da DSe und DSp in letzterem Fall eigentlich die Fähigkeit des zu untersuchenden Testverfahrens widerspiegeln, mit dem Referenztest übereinstimmende Ergebnisse zu liefern, muss man hier exakter Weise von „relativer“ DSe (rDSe) bzw. „relativer“ DSp (rDSp) sprechen (Martin *et al.*, 1987).

DSe und DSp können durch die Wahl der Entscheidungsgrenze (Cutoff) beeinflusst werden. Je höher der Cutoff eines Tests angelegt wird, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass er von den Messwerten antikörperfreier Proben überschritten wird. Die DSp steigt somit. Auf die DSe hat die Erhöhung des Cutoff dagegen einen kontraproduktiven Effekt, da eventuell nur schwach reagierende, antikörperhaltige Proben nicht mehr als positiv erfasst werden können.

Bereits bei der Auswahl diagnostischer Tests für ein bestimmtes Untersuchungsziel sollte die zu erwartende DSe und DSp berücksichtigt werden (Murphy *et al.*, 1999). Ein hochsensitiver Test wird beispielsweise benötigt, wenn im Rahmen von Überwachungsprogrammen positive Tiere auf keinen Fall übersehen werden dürfen (z.B. im Falle ernster Erkrankungen oder zur Eradikation einer Krankheit). Zur Überbefundung von, mit einem sehr sensitiven

aber wenig spezifischen Test gestellten Diagnosen ist dagegen ein Testverfahren erforderlich, das eine hohe Spezifität besitzt und möglichst auf einem von ersterem Verfahren unabhängigen Testprinzip beruhen sollte.

Streng zu unterscheiden von der DSe bzw. der DSp sind die analytische Sensitivität (ASe) bzw. Spezifität (ASp), die aber in gewisser Weise die ersten beiden Parameter beeinflussen. Erstere definiert die minimale Nachweisgrenze eines Tests, das heißt die geringste detektierbare Konzentration der gesuchten Substanz. Die ASp steht dagegen für die Fähigkeit eines Tests, nur die gesuchte Substanz zu erkennen. Sie ist umso höher, je geringer der Einfluss kreuzreagierender Substanzen auf die Testergebnisse ist (Miller *et al.*, 1991). Die Verwendung aufgereinigter anstelle von nativen Reagenten sowie leistungsstarker Detektionssysteme und -geräte erhöht die ASe. Die Höhe der ASp ist neben der Reinheit der Reagenten, im Falle des Antikörpernachweises der Antigenpräparation und der Detektionsantikörper, von der Empfindlichkeit des Tests gegenüber unspezifisch reagierenden Substanzen abhängig. Virusneutralisationstest und HAH besitzen von ihrem Testprinzip her eine hohe Spezifität, da sie nur Antikörper messen, die gegen bestimmte in der Regel virustypspezifische Epitope gerichtet sind (Murphy *et al.*, 1999). Andererseits ist zumindest der HAH jedoch sehr anfällig für in der Probe enthaltene, unspezifisch reagierende Substanzen (s. Abschnitt 2.5.1.4).

2.6.2 Richtigkeit und Wiederholbarkeit (Regressionsanalyse und Korrelation)

Die Richtigkeit der mit einem bestimmten Test gewonnenen Ergebnisse kann durch Untersuchung der Übereinstimmung (Korrelation) dieser mit den Ergebnissen eines Referenztests ermittelt werden. Eine Aussage über die Verlässlichkeit der mit einem Test erhaltenen Ergebnisse liefert die wiederholte Untersuchung der gleichen Proben unter den gleichen Versuchsbedingungen und eine anschließende Überprüfung der Korrelation der Ergebnisse. Beiderlei Vergleiche sind über eine lineare Regressionsanalyse möglich. Hierzu werden die für die einzelnen Proben in den jeweiligen Testansätzen erhaltenen Ergebnisse einander in einem Diagramm gegenübergestellt und einem statistischen Vergleich mit Berechnung des Korrelationskoeffizienten (r) unterzogen (Sachs, 2006). Der

Korrelationskoeffizient wird mit Hilfe der Pearson's product-moment correlation errechnet und kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Eine Korrelation von +1 bedeutet, dass es eine perfekt positive Beziehung zwischen den Variablen, also den Ergebnissen von Test 1 und Test 2 gibt (d.h., steigt die eine Variable um eine Einheit, steigt auch die andere um eine Einheit). Eine Korrelation von -1 sagt aus, dass eine perfekt negative Beziehung zwischen den Ergebnissen der Tests besteht (d.h., steigt die eine Variable um eine Einheit, so sinkt die andere um eine Einheit). Eine Korrelation von 0 steht dagegen für den Fall, dass überhaupt kein linearer Zusammenhang zwischen den zwei betrachteten Variablen existiert. Die Extremwerte -1, 0 und +1 sind sehr selten. Im Grunde gibt der Korrelationskoeffizient nur an, ob eine positive oder eine negative Korrelation zwischen den Tests besteht. Ob der Grad der Korrelation gut oder schlecht ist, hängt von dem untersuchten Problem ab und ist Interpretationssache. Parameter wie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P-Wert, P) und das Signifikanzniveau (level of significance, α) ermöglichen eine gewisse Aussage darüber, ob die ermittelte Korrelation signifikant ist oder lediglich zufällig zustande gekommen ist. Signifikanz liegt vor, wenn der P-Wert kleiner als oder gleich groß wie das festgelegte Signifikanzniveau ist. Je kleiner der P-Wert ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die ermittelte Korrelation nur zufällig ist. Das Signifikanzniveau wird im Vorfeld der Untersuchungen festgelegt. Eingebürgert hat sich ein Wert von 5%, der gegebenenfalls korrigiert werden muss. Bei der Untersuchung der Korrelation mehrerer Tests ist dies zum Beispiel über die Bonferroni-Korrektur möglich.

2.6.3 Positiver und negativer Vorhersagewert

Während Sensitivität und Spezifität testabhängige Parameter sind, wird der positive und der negative Vorhersagewert eines Tests in hohem Maße von der Prävalenz der jeweiligen Krankheit (Infektion) in der untersuchten Population bestimmt. Beide Parameter haben somit nur unter Berücksichtigung der jeweiligen Prävalenzbedingungen eine Aussagekraft (Miller *et al.*, 1991). Der positive Vorhersagewert (positive predictive value, PPV) steht für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein positives Testergebnis auch mit einer positiven Probe assoziiert ist:

PPV = (Anzahl richtig positiver Ergebnisse / Anzahl richtig positiver Ergebnisse plus Anzahl falsch positiver Ergebnisse) × 100

Der negative Vorhersagewert (negative predictive value, NPV) gibt dagegen an, wie wahrscheinlich es ist, dass ein negatives Testergebnis richtig negativ ist.

NPV = (Anzahl richtig negativer Ergebnisse / Anzahl richtig negativer Ergebnisse plus Anzahl falsch negativer Ergebnisse) × 100

Auch wenn der zu analysierende Test eine gute DSe und DS_p aufweist, können sein PPV und sein NPV und damit die Richtigkeit seiner Testergebnisse, je nach der Prävalenz der Infektion in der Untersuchungspopulation, starken Schwankungen unterliegen. In einer Population mit niedriger Infektionsrate kann der PPV ein und desselben Tests wesentlich niedriger ausfallen, als in einer Population mit hoher Infektionsrate. Ein Test, der sogar in einer Testpopulation mit niedriger Krankheitsprävalenz einen hohen PPV aufweist, ist somit sehr gut geeignet für einen Einsatz, bei dem falsch positive Beurteilungen auf jeden Fall vermieden werden müssen. PPV und NPV sind demnach wichtige Auswahlkriterien für einen Test bei bekannter oder zumindest vermuteter Prävalenz.

2.7 Anforderungen an serologische Tests in der heutigen Zeit

Den aktuellen Bedürfnissen entsprechende serologische Testverfahren sollen eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen, preiswert sein sowie gleichzeitig schnell und einfach in ihrer Durchführung (Murphy *et al.*, 1999). Diese Forderungen ergeben sich aus der zunehmenden Bedeutung serologischer „Screening“- und „Monitoring“-Programme im Rahmen epidemiologischer Studien oder zur Planung und Erfolgskontrolle von Impfungen. Die Verwirklichung dieser Ansprüche hat in den letzten Jahrzehnten zu einer erheblichen Weiter- und Neuentwicklung serologischer Methoden beigetragen. Ein sehr anschauliches Beispiel hierfür ist der ELISA, der bereits seit längerer Zeit, insbesondere für Hühnervögel und Puten, in großer Zahl und Variation auch kommerziell hergestellt wird (Murphy *et al.*, 1999). Durch eine höchstmögliche Standardisierung und Automatisierung ihrer

Durchführung und Auswertung konnte die Objektivität vieler serologischer Methoden in den letzten Jahren gesteigert sowie durch eine Miniaturisierung der Testsysteme die Materialkosten bei gleichzeitiger Erhöhung des Probendurchsatzes verringert werden. Eine Gegenüberstellung der Eigenschaften bzw. Vor- und Nachteile einer Auswahl serologischer Tests bietet Tabelle 5.

Tabelle 5. Vor- und Nachteile serologischer Testverfahren

	Test						
	HAA	ELISA	cELISA	IF-Test	N-Test	AGP	WB
einfache Durchführung	ja	ja	ja	nein	nein	ja	nein
geringer Zeitaufwand	ja	ja	ja	mittel	nein	ja	nein
kostengünstig	ja	mittel	mittel	nein	nein	ja	nein
gut automatisierbar	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein
hoher Probendurchsatz	mittel	ja	ja	mittel	mittel	nein	nein
objektive Auswertung	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein
geringer Geräteaufwand	ja	1	1	2	3	ja	4
quantitativ	ja	ja	ja	nein	ja	nein	nein
Serotypisierung	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
hohe Sensitivität	mittel	ja	ja	ja	mittel	nein	ja
hohe Spezifität	ja	ja	ja	mittel	mittel	nein	ja
geringe unspezifische Reaktionen	nein	mittel	mittel	nein	mittel	nein	ja
Besonderheit		5,6	5	6,7	7		5,6

notwendige Mittel:

¹ELISA-Reader

²Fluoreszenzmikroskop




³Lichtmikroskop

⁴Dokumentationssystem

⁵aufgereinigtes Antigen

⁶speziesspezifischer Antikörper

⁷Zellkultusystem

	ja
	mittel
	nein

2.8 Aktuelle Situation der serologischen Diagnostik beim Wassergeflügel

Das Spektrum der beim Wassergeflügel zur serologischen Diagnostik einsetzbaren Tests unterscheidet sich nicht wesentlich von dem bei Hühnern oder Säugetieren. So kommen oder kamen herkömmliche Methoden wie Neutralisationstest, HAH, IF-Test oder AGP auch beim Wassergeflügel zur Anwendung (Tabelle 6). Der IF-Test wird heute meist nur noch zur Klärung spezieller Fragestellungen herangezogen. Der HAH gilt dagegen für den serologischen Nachweis von Infektionen mit hämagglutinierenden Viren, allen voran Ortho- und Paramyxoviren, als Standardtest in Routinediagnostik und Forschung sowie als Vergleichstest zur Beurteilung anderer Methoden (Office International des Épizooties, 2008). In Studien zur Bestimmung der Antikörperprävalenz gegen die oben genannten Viren bei wildem und domestiziertem Wassergeflügel wurde und wird in der Regel dieser Test eingesetzt (Tabelle 6). Mit der Entwicklung des Prinzips der Enzymimmunoassays in den frühen 70er Jahren (s. Abschnitt 2.5.2.1) gewannen neben dem HAH derartige Testsysteme, allen voran der ELISA, immer mehr an Bedeutung. Während der ELISA bei Huhn und Pute aufgrund seiner Vorzüge schon seit längerer Zeit fester Bestandteil der Routinediagnostik ist, besteht beim Wassergeflügel noch einiger Nachholbedarf. Das Testprinzip des indirekten ELISA kam selbst in epidemiologischen Studien bei diesen Spezies bisher nur selten zum Einsatz. Arenas *et al.* (1990) und Astorga *et al.* (1994b) zogen ihn zum Nachweis von Antikörpern gegen aviäre Inflenzaviren bei Wildvögeln, unter anderem auch wildem Wassergeflügel, heran. Beide bedienten sich jedoch eines Anti-Huhn-Konjugates. Speziell gegen Wassergeflügel-Immunglobulin gerichtete Konjugate stellten sich dagegen Zhao *et al.* (1991) zum Nachweis von Antikörpern gegen Picornaviren und Hlinak *et al.* (1992a, 1998) zur Detektion von Antikörpern gegen Reo-, Picorna- und APMV-1 her. Obwohl diese Forschungsgruppen den indirekten ELISA als eine zum Antikörpernachweis auch beim Wassergeflügel probate Methode bewerteten, wurden bisher kaum Anstrengungen unternommen, die Entwicklung des Testverfahrens zum Einsatz bei diesen Vogelspezies weiter voranzutreiben. Zur Testung größerer Probenmengen wird dagegen immer häufiger auf kommerzielle, eigentlich für Hühner hergestellte, kompetitive ELISA-Systeme ausgewichen.

Dem Western Blot kommt aus arbeitstechnischen Gründen bisher in der Regel eine mehr analytische oder bestätigende Funktion zu (Murphy *et al.*, 1999).

Tabelle 6. Beim Wassergeflügel zum Einsatz kommende serologische Testverfahren

Jahr	Test							Antikörper gegen	Referenz
	HAH	N-Test	ELISA	CELISA	AGP	IF-Test	NI-Test		
1945								APMV-1	Iyer
1947								APMV-1	Asplin
1958								APMV-1	Page
1966								APMV-1	Bradshaw & Trainer
1970								APMV-1	Friend & Trainer
1970								APMV-1	Palmer & Trainer
1972								APMV-1	Friend & Trainer
1972								APMV-1	Weidenmüller
1973								APMV-1, ArboV ¹	Hore <i>et al.</i>
1975								APMV-1	Pearson & McCann
1975								APMV-1	Spalatin & Hanson
1978								APMV-1	Shortridge
1982								APMV-1	Al Imadi & Tanyi
1982								APMV-1	Vickers & Hanson (a)
1985								AIV	Nettles <i>et al.</i>
1987								APMV, AIV	Marius-Jestin <i>et al.</i>
1990								AIV	Arenas <i>et al.</i>
1991								Picornav	Zhao <i>et al.</i>
1992								APMV-1	Hlinak <i>et al.</i> (a)
1993								APMV-1	Ziedler & Hlinak
1994								AIV	Astorga <i>et al.</i> (b)
1994								APMV	Maldonado <i>et al.</i>
1995								APMV	Maldonado <i>et al.</i>

Jahr	Test							Antikörper gegen	Referenz
	HAH	N-Test	ELISA	ELISA	AGP	IF-Test	NI-Test		
1995	1	2	3					APMV, AIV ¹ , EDSV ¹ , ReoV ^{2,3} , PicornaV ² , ParvoV ²	Ziedler <i>et al.</i>
1996								ParvoV	Kardi & Szegletes
1997	1	2						APMV, AIV ¹ , EDSV ¹ , AdenoV ² , ReoV ² , HerpesV ²	Bolte <i>et al.</i>
1998	1	3	α-G ²					APMV-1, EDSV ¹ , ReoV ² , PicornaV ² , ParvoV ³	Hlinak <i>et al.</i>
1999								ParvoV	Takehara <i>et al.</i>
1999								APMV-1	Schelling <i>et al.</i>
2000								AIV	Pfitzer <i>et al.</i>
2001								APMV-1	Bolte <i>et al.</i>
2001								APMV-1	Stanislawek <i>et al.</i>
2002								APMV, AIV	Stanislawek <i>et al.</i>
2003								AIV	De Marco <i>et al.</i>
2004								AIV	De Marco <i>et al.</i>
2005								ParvoV	Wang <i>et al.</i>
2005								APMV-1	Zanetti <i>et al.</i>
2008	1							APMV-1, AIV, ArboV ¹	Lindh <i>et al.</i>
2008								MetapneumoV	Turpin <i>et al.</i>

α-H = Anti-Huhn-Konjugat

α-E = Anti-Enten-Konjugat

α-G = Anti-Gans-Konjugat

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Evaluation of Newcastle disease virus immunoassays for waterfowl using a monoclonal antibody specific for the duck immunoglobulin light chain

Sonja Kothlow¹, Rafaela Häuslaigner^{2,3}, Bernd Kaspers¹ and Christian Grund^{2,3*}

¹*Institute for Animal Physiology, University of Munich, Veterinärstrasse 13, D-80539 Munich, Germany,* ²*Klinik für Vögel, University of Munich, Sonnenstrasse 18, 85764 Munich, Germany,* and ³*present address: Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, 17493 Greifswald Insel Riems, Germany*

**To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 38351 7 196. Fax: +49 38351 7 226. E-mail: Christian.Grund@fli.bund.de*

The first two authors contributed equally to this work.

3.1.1 Abstract

In the present study a monoclonal antibody (mAb 14A3) was tested for its reactivity against serum immunoglobulin Y (IgY) of several waterfowl species, and subsequently for its applicability as anti-species antibody in common immunoassays. Western blot analyses demonstrated its broad cross-reactivity with the serum IgY light chain of different duck species: Muscovy duck (*Cairina moschata*), Mallard (*Anas platyrhynchos*), white-winged wood duck (*Asarcornis scutulatus*), common pintail (*Dafila acuta*). Reactivity was also evident with IgY of two swan species—mute swan (*Cygnus olor*) and black-necked swan (*Sthenelides melanocoryphus*)—and two goose species—domestic goose (*Anser anser var. domestica*) and red-breasted goose (*Rufibrenta ruficollis*). Applying the mAb for Newcastle disease virus (avian paramyxovirus serotype 1 [APMV-1]) test systems, its functionality within indirect immunoassays was evaluated. Using APMV-1-positive sera of domestic geese and Muscovy ducks, mAb 14A3 facilitated specific staining of APMV-1-infected cells in an

immunofluorescence test. In addition, it proved to be functional in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a western blot assay. Thus, the analysed mAb represents an attractive and versatile reagent that offers the opportunity to develop serological tests for waterfowl, allowing a high sample throughput using the ELISA technique or the fine analysis of humoral immune responses using the western blot.

3.1.2 Introduction

In comparison with the situation in chickens or mammals, efficient indirect test systems for the diagnosis of important bacterial and viral infections in waterfowl that correspond with current economical and public health demands are not yet sufficiently established and commercially available.

This fact conflicts with a rising importance of serological surveillance in waterfowl. Among the bacterial pathogens, *Salmonella* is an example in this context that is harboured by wild as well as domestic aquatic birds (Refsum *et al.*, 2002). Commercially kept waterfowl, especially under extensive rearing conditions, can further attract a number of viral infections with economical impact, like reoviruses, herpesviruses and parvoviruses, which have to be monitored and diagnosed (Bernius, 1997; Hess & Paré, 2004). Of particular concern for the poultry industry are infections with viruses that are transmissible to gallinaceous birds, such as Newcastle disease viruses (NDV) (avian paramyxovirus serotype 1 [APMV-1]) and avian influenza viruses (Takakuwa *et al.*, 1998; Campitelli *et al.*, 2004). Beyond this, waterfowl also represent a reservoir of pathogens for humans (Reed *et al.*, 2003). Therefore, regular screening tests are of high importance in the prevention and combat of diseases that represent a threat on economy or human health.

Expectations are that, in addition to high sensitivity and specificity, serological tests have to achieve speed, simplicity and low cost. Automation of the technical process and the evaluation, as well as the compatibility with large sample numbers, are further demands (O'Beirne & Sever, 1992; Murphy *et al.*, 1999). Tests used as methods of choice in former times, such as the haemagglutination inhibition (HI) test or the agar gel precipitation test are, at least in the first steps of diagnosis, being more and more displaced by faster, automated tests such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In contrast to the

situation in chickens and turkeys, where suitable indirect ELISA test kits have been established (Slaght *et al.*, 1978; Marquart *et al.*, 1980) and are now widely used and commercially available, diagnostics in waterfowl still rely on the standard tests, or at the best on competitive ELISA tests. Efforts to develop suitable tools, such as anti-species antibodies for waterfowl, lagged significantly behind the situation in galliform species. Recently, we have developed a range of new monoclonal antibodies reactive with leucocyte cell surface antigens of the duck including a monoclonal antibody (mAb 14A3) reactive with the duck immunoglobulin (Ig) light chain (Kothlow *et al.*, 2005). Here we further evaluate the cross-reactivity of mAb 14A3 with serum immunoglobulins (IgY) of different waterfowl species, as well as its applicability in common serological test systems to detect APMV-1-positive reactants.

3.1.3 Materials and Methods

Production of monoclonal antibodies. mAb 14A3 was obtained after immunization of Balb/c mice with 100 µg purified duck IgY emulsified in Freund's complete adjuvant, followed by three booster immunizations in Freund's incomplete adjuvant. Fusions were performed as described elsewhere (Kothlow *et al.*, 2005) and positive hybridomas were identified by ELISA (Kothlow *et al.*, 2005) and western blot (WB).

Sera. To test the cross-reactivity of mAb 14A3, field sera from the eight different waterfowl species specified in Figure 1, and chicken serum, were obtained. APMV-1-positive waterfowl sera were derived from immunized adult Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and adult domestic geese (*Anser anser var. domestica*) that received a two-fold chicken dose of an inactivated APMV-1 vaccine (Nobilis Newcavac[®], batch 49089 PK 95/1179) subcutaneously. Sera obtained before immunization and at the indicated time points after vaccination were stored at -20°C.

Western blot analysis to determine the cross-reactivity of mAb 14A3. Serum immunoglobulins were separated by 10% glycine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (glycine-SDS-PAGE) under denaturing conditions, following standard

procedures (Laemmli, 1970) and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) by semi-dry blotting. Membranes were blocked for 60 min with 2% w/v skim milk in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) containing 0.1% Tween 20, before probing with mAb 14A3 cell culture supernatant at a dilution of 1:100 in Tris-buffered saline (50 mM Tris, pH 7.5), containing 0.1% Tween 20 (TBST buffer) plus 3% w/v skim milk. Incubation took place overnight at 4°C under agitation. Membranes were washed three times for 5 min in TBST buffer and then covered for 30 min with horseradish peroxidase-conjugated goat-anti-mouse Ig-specific polyclonal antibodies (Sigma), at a dilution of 1:5000 with 3% skim milk in TBST buffer. Incubation was performed at room temperature on a shaker. After three further washing steps, membranes were finally incubated for 5 min with a horseradish peroxidase substrate (ECL plus Western Blotting Detection System; Amersham Biosciences) and reaction was visualized by autoradiography on a medical X-ray film (AGFA Curix HT 1.000 G+).

Indirect immunofluorescence test. Virus was grown on chicken embryo liver cells, prepared from 10-day-old embryonated specific pathogen free fowls' eggs according to standard procedures (Mayr *et al.*, 1974), and cultured on microscope slides with removable cups (Sonic Seal Slide Wells; Nunc). After their adherence, cells were infected with APMV-1 strain La Sota. With the appearance of visible cytopathic effects, approximately 16 h later, cells were fixed with formalin (3.7% in PBS; 2×10 min). Formalin was removed and cells were treated with Triton (1% in PBS; 1×shortly and 1×for 30 min). Thereafter, slides were blocked for 1 h with 2% v/v foetal calf serum in PBS (blocking buffer). Test serum was added at a dilution of 1:50 in blocking buffer, for an incubation time of 30 min, followed by three 5-min washes with PBS containing 0.1% Tween 20. The cups were then incubated for 30 min with mAb 14A3 cell culture supernatant (1:10 in blocking buffer) and again washed three times. FITC-conjugated sheep anti-mouse-IgG (Sigma) (1:50 in blocking buffer) was added to each well for 30 min, also followed by three washing steps. Finally, cups were removed and the slides were covered with SHANDON-Mounting Medium (Thermo Electron Corporation) and a cover slip. Analysis was carried out using a leica fluorescence microscope, and images were taken with the help of a microscope camera (Leica).

Enzyme-linked immunosorbent assay. The ELISA was performed in Polysorp Immuno Plates (Nunc). To permit binding of the antigen, plates were incubated overnight at room temperature with 50 µl purified antigen of APMV-1 strain La Sota, diluted in bicarbonate buffer (4.2 g NaHCO₃ /l in Aqua bidest, pH 9.6). The next day, plates were washed three times in washing buffer (PBS plus 0.025% Tween 20) and blocked for 60 min with blocking buffer (2% skim milk in washing buffer). Two-fold dilutions of the test sera were done in blocking buffer (beginning with 1:50) and 50 µl was transferred in duplicate to the antigen-coated wells. Following an incubation period of 30 min and three subsequent washing steps, 50 µl mAb 14A3 was added to each well (1:10 in blocking buffer). Thirty minutes later, plates were washed again and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat-anti-mouse Ig-specific polyclonal antibodies (Sigma) (1:250 in blocking buffer, 50 µl/well). After 30 min and following another washing procedure, 100 µl of the substrate (*ortho*-phenyldiamidihydrochloride; Sigma) were added to each well at a concentration of 1 mg/ml in citrate-buffer plus hydrogen peroxide (0.05 M Na-Citrate pH 4 + 0.15% H₂O₂). After 10 min in darkness the reaction was stopped with 50 µl of 2 M sulphuric acid in aqua bidest. Optical density was measured by an ELISA-reader (MR 5000 Dynatech Laboratories), using a test filter with an absorption wavelength of 490 nm. Titres were determined by defining the cut-off value as the mean optical density value of the 1:200 dilution of the sera taken on the day of immunization (background noise) plus the two-fold standard deviation.

Haemagglutination inhibition test. The HI test was performed according to standard protocols (Office International des Epizooties, 2004). Titres were expressed as log₂ values of the highest reciprocal of the dilution that showed no haemagglutination, and in the following are named HI titres. HI end-points of four or greater were considered positive.

Western blot analysis using mAb 14A3 as secondary antibody. APMV-1 antigens were subjected to glycine-SDS-PAGE, blotted on nitrocellulose membranes and blocked for 60 min as described above. Test sera were pre-incubated for 1 h with allantoic fluid, to diminish unspecific reactivity, centrifuged for 10 min at 6077×g and then brought to a final dilution of 1:1000 with 3% skimmed milk in TBST buffer. Membrane strips were then incubated overnight with the diluted test sera at 4°C, on a shaker. After three 5-min washes with TBST buffer, mAb 14A3 cell culture supernatant was added at a dilution of 1:100 in TBST buffer,

containing 3% w/v skimmed milk. The following steps correspond with the WB procedure described above.

3.1.4 Results

To evaluate possible cross-reactivities of mAb 14A3 with serum IgYs of different waterfowl species, sera from two goose, two swan and four duck species as well as a chicken serum were tested by WB analysis, using mAb 14A3 as a probe. In the positive control sera of a domestic goose and a Muscovy duck, clear reactivity, at a position identical with that indicating the Ig light chain in a preceding study of Kothlow *et al.* (2005), was visible. All sera of six further waterfowl species also showed this kind of typical band, whereas no specific reaction was noted with the chicken serum (Figure 1). Strongest bands were observed with the light chain of the two swan species from the Subfamily *Anserinae*—mute swan (*Cygnus olor*) and black-necked swan (*Sthenelides melanocoryphus*)—as well as with that of the Mallard (*Anas platyrhynchos*) and the common pintail (*Dafila acuta*) belonging to the Tribus *Anatini* in the Subfamily *Anatinae*. Moderate bands were visible with samples from the Muscovy duck (*Cairina moschata*) and the white-winged wood duck (*Asarcornis scutulatus*) from the Tribus *Cairinini* in the Subfamily *Anatinae*. The two goose species, domestic goose (*Anser anser var. domestica*) and red-breasted goose (*Rufibrenta ruficollis*) from the Subfamily *Anserinae*, finally yielded the weakest bands. However, in all cases a clear signal was found by WB, confirming the specificity and demonstrating the broad cross-reactivity within the order of *Anseriformes* (Table 1).

To test the possibility of using mAb 14A3 in immunoassays, we further analysed whether the monoclonal antibody could facilitate the detection of substrate bound antibodies from geese and Muscovy ducks. Therefore, using mAb 14A3 as secondary antibody, an indirect immunofluorescence test was conducted with sera of APMV-1-positive domestic geese and Muscovy ducks. A representative result is shown in Figure 2. In APMV-1-infected cell cultures, clear foci of typical cytopathic effects with formation of giant cells were visible, represented by cytoplasmic fluorescence and mottled appearance of the cells. In addition, the nuclei of some elongated cells also showed a bright fluorescence. These foci of alteration

were surrounded by uninfected cells that did not show any staining. In uninfected controls, no signal was observed (data not shown).

We next analysed the applicability of mAb 14A3 as secondary antibody in an indirect ELISA system. Selected APMV-1-positive sera from domestic geese and Muscovy ducks taken at specific time points after immunization with an inactivated APMV-1 vaccine were titrated within this test system. As shown in Figure 3a for one individual goose (serum dilutions are given as \log_2 (dilution \times 50)), serum taken on the day of immunization yields very little reactivity. At a serum dilution of 1:50 (=0), the optical density did not surmount a value of 0.2 and background noise is negligible from a dilution of 1:200 (=2) onwards. However, 3 weeks post vaccination a clear seroconversion became evident by increased reactivity (optical density of 1.557 at a dilution of 1:50). This clear reactivity is also detectable with sera taken at the two subsequent time points tested. At higher serum dilutions, reactivity declined. For sera obtained 3, 7 and 10 weeks after immunization, reactivity remains above that of the sera taken prior to immunization up to a dilution of 1:6400 (=7), 1:1600 (=5) and 1:25 600 (=9), respectively. Comparable results were obtained for four other birds tested by ELISA titration.

Comparing the results of the ELISA titration with serum titres measured by the conventional HI test, a parallel development in the titre course could be demonstrated (Figure 3b). Like the ELISA test, the HI test revealed a distinct seroconversion 3 weeks after immunization. All samples taken at that time point had an HI titre of 32 ($\log_2=5$) or greater. The ELISA titres were predominantly 10-fold to 100-fold higher, being 400 ($\log_2=8.64$) or greater. In nearly all birds tested, a second or further titre rise was detectable in both tests 10 weeks post vaccination. At that time point, highest \log_2 titres were reached (HI 8 to 10, ELISA 10.64 to 15.64).

The specificity of sero-reactivity to APMV-1 was confirmed by WB analysis. Sera taken at the day of vaccination produced no APMV-specific reaction on radiography (Figure 4). In agreement with the ELISA data, 3 weeks post vaccination strong reactivity with APMV proteins, and in particular with the comigrating phosphoprotein, nucleoprotein and fusion protein 1, was detectable. Moderate bands were visible at the position of the haemagglutinin-neuraminidase protein (HN), which was detected by the HI test. Seven weeks post vaccination, reactivity in duck sera declined, whereas in goose sera the bands seemed to be more distinct. Both bird species showed highest reactivities 10 weeks post

vaccination. At that time point, especially in the goose, an additional band at the position of the matrix protein was visible.

3.1.5 Discussion

In this study we describe a monoclonal antibody with a specific reactivity to waterfowl IgY and evaluate its applicability in a variety of serological assay systems to detect APMV1-positive reactants.

mAb 14A3 had been characterized as a useful tool for flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations (Kothlow *et al.*, 2005) and showed reactivity with serum from different waterfowl species. Here we complement this initial analysis by cross-reactivity testing with a wider range of waterfowl species. The monoclonal antibody shows strong reactivity with the Ig light chain of swans (Subfamily *Anserinae*) and ducks of the Tribus *Anatini* (Subfamily *Anatinae*), and to a somewhat lesser extent with that of ducks of the Tribus *Cairinini* (Subfamily *Anatinae*) or geese (Subfamily *Anserinae*). The fact that antibodies to serum Igs of one bird species cross-react with sera from other avian species is not an uncommon phenomenon. Similar results were obtained in earlier studies. Baxendale *et al.* (1971) demonstrated that both rabbit anti-pigeon and rabbit anti-chicken serum react with serum-proteins of common pheasants (*Phasianus colchicus*), domestic Mallards (*Anas platyrhynchos var. domestica*), domestic chickens (*Gallus gallus var. domestica*), turkeys (*Meleagris gallopavo*), domestic pigeons (*Columba livia var. domestica*) and house sparrows (*Passer var. domesticus*). Cromie *et al.* (1993) observed cross-reactivities between a polyclonal anti-duck antibody and serum of feral Barnacle geese (*Branta leucopsis*). Baghian *et al.* (1999) reported a broad cross-reactivity of an anti-cockatiel IgY hyperimmune serum in the agar gel precipitation test, including several birds of the Order *Psittaciformes*. However, the results of our cross-reactivity test differ from the results of these studies by the fact that a monoclonal antibody, directed against specific epitopes of the IgY molecule was used. Taking this fact into consideration, the degree of cross-reactivity is even more notable and confirms the close phylogenetic relationship among the *Anseriformes*.

Concerning the observation of different strength in the reaction of mAb 14A3, it is tempting to speculate that the degree of cross-reactivity correlates with phylogenetic relationships

within the order *Anatiformes*, Family *Anatidae* (Table 1). However, as the sera were not normalized with respect to their Ig content, it seems more plausible that the differences in the degree of reactivity are due to variable concentrations of Igs in the serum of the individual birds. Importantly, the results of this study show clearly that the observed differences in the strength of reactivity do not affect the discrimination of positive and negative sera within different serological test systems.

The results of the immunofluorescence test, ELISA and WB analyses prove the function of the mAb 14A3 as part of an antibody cascade. The monoclonal antibody detects serum Igs in their native conformation and binds to substrate bound antibodies. In the immunofluorescence test, the ELISA and the WB, therefore, it is able to mediate, as secondary antibody, the binding between virus specific antibodies and a tertiary FITC-conjugated or horseradish peroxidase (POD)-conjugated antibody. The specificity of the reaction in the immunofluorescence test is verified by the fact that foci of infected cells are clearly distinguishable from surrounding uninfected cells or from cells in uninfected control cups, respectively. As known for paramyxoviruses, antigen seems to be present predominantly in the cytoplasm, but can also appear in some of the nuclei, described as intranuclear inclusion bodies by Granzow *et al.* (1999).

Like the ELISA, the WB also correlated well with the HI test, concerning the differentiation between positive and negative sera. Remarkably, by WB analysis, only low reactivity towards the HN protein was observed, despite HN-specific antibodies measured in high titres by the HI test. It was shown by Crennell *et al.* (2000) and Connaris *et al.* (2002) in crystallographic studies that the three-dimensional structure of the globular head of the HN glycoprotein forms specific receptor binding sites. Whereas in the HI test HN proteins are present as native epitopes, they show predominantly a linear structure in the WB under denaturing conditions. The lack of reactivity in the WB, in contrast to the corresponding high HI titres, indicates that the immune reaction to the HI-active part of the HN protein is directed predominantly against conformational dependent epitopes. This is corroborated by the observations of Iorio & Bratt (1983) that monoclonal antibodies, directed against the HN protein, only bind to HN in nitrocellulose transfers of sodium dodecyl sulphate gels, if it has been neither reduced nor boiled.

A logical consequence is that differentiation between APMV serotypes is only possible in the HI test, whereas WB and ELISA are only capable to detect APMV-positive sera. Applying mAb

14A3 in routine immunoassays, the indirect ELISA would be the method of choice in the screening of sera for APMV-specific antibodies. By WB analysis, virus-specific reaction can be verified. This is valuable, considering the high non-specific reactivity often observed in sera of lower quality, a frequent problem concerning field sera from wild birds.

Of further importance is the fact that mAb 14A3 can be employed in the detection of infections with other viral agents, for example avian influenza viruses. As waterfowl represents a potential reservoir for orthomyxoviruses, monitoring of wild aquatic birds can be of great importance. Detection of antibodies against avian influenza viruses indicates that, also at time points where no virus shedding occurs, the bird has been in contact with the infectious agent. In addition, the problem of interference with antibodies produced subsequently to vaccination, known from domestic poultry, does not exist in wild birds. Therefore suitable serological tests such as an ELISA for waterfowl can help to determine the avian influenza viruses infection rate in these birds, offering the possibility of a systematic surveillance in relevant areas and an evaluation of the resulting infection pressure on more susceptible poultry species.

3.1.6 References

Baghian, A., Reyes, C.V., Mendoza, A., Tully, T. & Kousoulas, K.G. (1999). Production of a rabbit anti-cockatiel immunoglobulin G and characterisation of its cross-reactivities with immunoglobulin G of other psittacine species. *Avian Diseases*, 43, 48-54.

Baxendale, W., Courtenay, J.S., Phillips, A.W. & Zola, H. (1971). Some properties of pigeon and other avian serum proteins. *The International Journal of Biochemistry*, 2, 419-422.

Bernius, E. (1997). Serologische Untersuchungen zum Vorkommen virusbedingter Infektionen und Krankheiten bei Hausgänsen aus Norddeutschland. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Campitelli, L., Mogavero, E., De Marco, M.A., Delogu, M., Puzelli, S., Frezza, F., Facchini, M., Chiapponi, C., Foni, E., Cordioli, P., Webby, R., Barigazzi, G., Webster, R.G. & Donatelli, I.

(2004). Interspecies transmission of an H7N3 influenza virus from wild birds to intensively reared domestic poultry in Italy. *Virology*, *20*, 24-36.

Connaris, H., Takimoto, T., Russell, R., Crennell, S., Moustafa, I., Portner, A. & Taylor, G. (2002). Probing the sialic acid binding site of the haemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion. *Journal of Virology*, *76*, 1816-1824.

Crennell, S., Takimoto, T., Portner, A. & Taylor, G. (2000). Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus haemagglutinin-neuraminidase. *Nature Structural Biology*, *7*, 1068-1074.

Cromie, R.L., Brown, M.J., Forbes, N.A., Morgan, J. & Stanford, J.L. (1993). A comparison and evaluation of techniques for diagnosis of avian tuberculosis in wildfowl. *Avian Pathology*, *22*, 617-630.

Granzow, H., Weiland, F., Mundt, E., Köllner, B. & Werner, O. (1999). Intranuclear inclusions in cells infected with Newcastle disease virus. *Journal of Veterinary Medicine. B*, *46*, 411-421.

Hess, J.C. & Paré, J.A. (2004). Viruses of waterfowl. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, *13*, 176-183.

Iorio, R.M. & Bratt, M.A. (1983). Monoclonal antibodies to Newcastle disease virus: delineation of four epitopes on the HN glycoprotein. *Journal of Virology*, *48*, 440-450.

Kothlow, S., Mannes, N.K., Schaerer, B., Rebeski, D.E., Kaspers, B. & Schultz, U. (2005). Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies. *Developmental and Comparative Immunology*, *29*, 733-748.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.

Marquardt, W.W., Johnson, R.B., Odenwald, W.B. & Schlotthober, B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*, 24, 375-385.

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. & Wittmann, G. (1974). *Virologische Arbeitsmethoden* Band I (Abschnitt: Zellkulturen). Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999). Laboratory diagnosis of viral diseases. In F.A. Murphy, E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek & M.J. Studdert (Eds.), *Veterinary Virology* 3rd edn (pp. 193-223). Oxford: Elsevier.

O'Beirne, A.J. & Sever, J.L. (1992). Enzyme immunoassay. In S. Specter & G. Lancz (Eds.), *Clinical Virology Manual* 2nd edn (pp. 153-170). New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier-Verlag.

Office International des Epizooties (2004). Newcastle disease. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 5th edn, vol 1 (pp. 270-282). Paris (France): OIE.

Reed, K.D., Meece, J.K., Henkel, J.S. & Shukla, S.K. (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clinical Medicine & Research*, 1, 5-12.

Refsum, T., Handeland, K., Baggesen, D.L., Holstad, G. & Kapperud, G. (2002). Salmonellae in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5595-5599.

Slaght, S.S., Yang, T.J., van der Heide, L. & Fredrickson, T.N. (1978). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity. *Avian Diseases*, 22, 802-805.

Takakuwa, H., Ito, T., Takada, A., Okazaki, K. & Kida, H. (1998). Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 45, 207-215.

Wolters, H.E. (1982). *Die Vogelarten der Erde*. Hamburg, Berlin: Paul Parey.

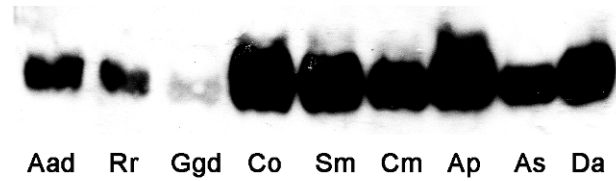


Figure 1. Cross-reactivity of mAb 14A3 with the light chain of IgG from different waterfowl species. Sera from eight different waterfowl species and a chicken were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and probed by mAb 14A3 in WB analysis. Reactivity is shown after exposure for 3 min. Species tested included: Aad, domestic goose (*A. anser* var. domestica); Rr, red-breasted goose (*R. ruficollis*); Ggd, domestic chicken (*G. gallus* var. domestica); Co, mute swan (*C. olor*); Sm, black-necked swan (*S. melanocoryphus*); Cm, Muscovy duck (*C. moschata*); Ap, Mallard (*A. platyrhynchos*); As, white-winged wood duck (*A. scutulatus*); Da, common pintail (*D. acuta*).

Table 1. Phylogenetic tree of eight selected waterfowl species, which were used to test the cross-reactivity of mAb 14A3 (Wolters 1982)

Order	<i>Anatiformes (Anseriformes)</i>		
Family	<i>Anatidae</i>		
Subfamily	<i>Anatidae —ducks</i>		
Tribus	<i>Carinini</i>		
Genus	<i>Cairina</i>	Species	<i>Cairina moschata</i> — Muscovy duck
Genus	<i>Asarcornis</i>	Species	<i>Asarcornis scutulatus</i> — white-winged wood duck
Tribus	<i>Anatini</i>		
Genus	<i>Anas</i>	Species	<i>Anas platyrhynchos</i> — Mallard
Genus	<i>Dafila</i>	Species	<i>Dafila acuta</i> — common pintail
Subfamily	<i>Anserinae — geese</i>		
Genus	<i>Anser</i>	Species	<i>Anser anser domesticus</i> — domestic goose
Genus	<i>Rufibrenta</i>	Species	<i>Rufibrenta ruficollis</i> — red-breasted goose
Genus	<i>Cygnus</i>	Species	<i>Cygnus olor</i> — mute swan
Genus	<i>Sthenelides</i>	Species	<i>Sthenelides melanocoryphus</i> — black-necked swan

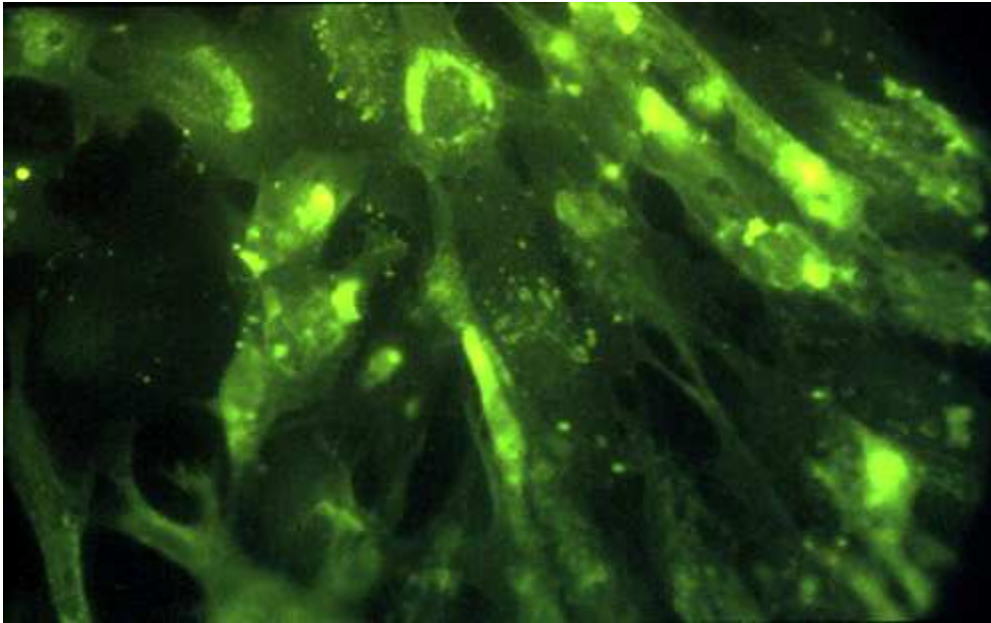


Figure 2. Suitability of mAb 14A3 to facilitate the detection of substrate bound antibodies in the indirect immunofluorescence test. APMV-1-infected primary chicken embryo liver cells were incubated with an APMV-1-seropositive goose serum. Subsequently mAb 14A3 was added, followed by the visualization of antigen-antibody complexes using FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies and a fluorescence microscope (100-fold magnification).

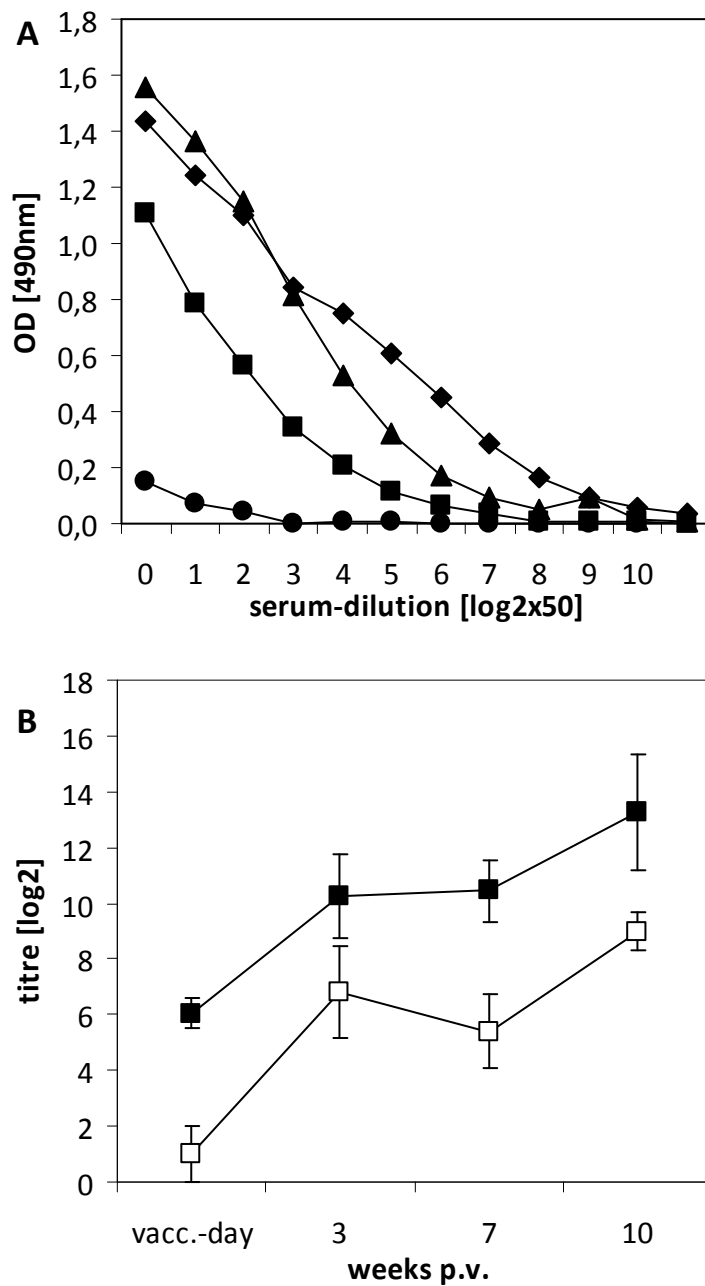


Figure 3. APMV-1 ELISA using mAb 14A3 as secondary antibody. Sera from domestic geese and Muscovy ducks, taken at different time points after immunization with an APMV-1 vaccine, were tested by ELISA. 3a: reactivity of sera from one representative goose with respect to different serum dilutions, expressed as the logarithm of serial two-fold dilutions starting at a dilution of 1:50 (day of immunization, ●; 3 weeks, ▲; 7 weeks, ■; and 10 weeks, ◆ thereafter). 3b: comparison of the reactivity of sera from three geese and two ducks, in ELISA (■) and HI test (□), expressed as the \log_2 of the average titres with corresponding standard deviations.

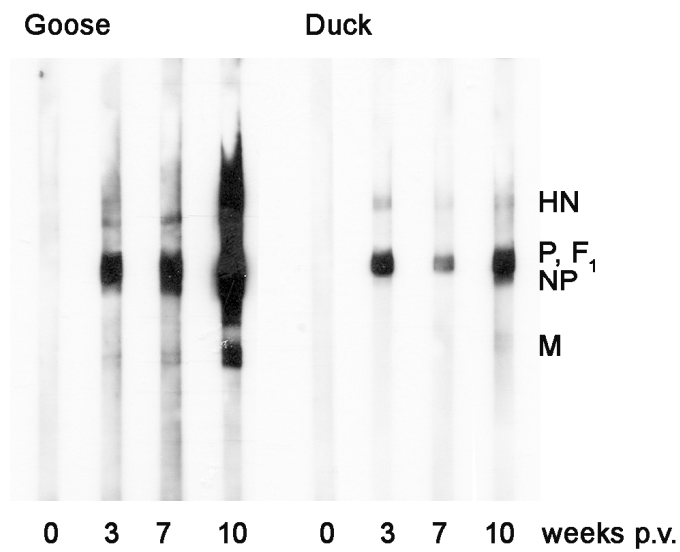


Figure 4. APMV-1-specific reactivity of goose and duck sera, confirmed by WB. Test sera from domestic geese and Muscovy ducks, collected at different time points after immunization with an APMV-1 vaccine, were tested for their reactivity to APMV-1 proteins. mAb 14A3 served as secondary antibody. Reactivity is shown after an exposure time of 10 sec. HN, haemagglutinin-neuraminidase; P, phosphoprotein; NP, nucleoprotein; F1, fusion protein 1; M, matrix protein; p.v., post vaccination.

3.2 Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to study the specific humoral immune response of Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser var. domestica*) after vaccination against Newcastle disease virus

Rafaela Häuslaigner^{1†}, Jana Sonnenburg², Sonja Kothlow³, Bernd Kaspers³, Christoph Staubach² and Christian Grund^{1**}

¹Klinik für Vögel, University of Munich, Sonnenstrasse 18, 85764 Munich, Germany, ²Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Seestrasse 55, 16868 Wusterhausen, Germany, and ³Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Veterinärstrasse 13, D-80539 Munich, Germany

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 38351 7 196. Fax: +49 38351 7 226.
E-mail: Christian.Grund@fli.bund.de

†Present adress: Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany.

3.2.1 Abstract

In this study an indirect Newcastle disease virus enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for waterfowl was evaluated concerning its efficiency and its suitability to monitor the antibody response in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser var. domestica*) following vaccination with a commercial inactivated NDV vaccine for chickens. Three weeks after vaccination seroconversion was already evident in the ELISA. Comparison of the ELISA results with those of the haemagglutination inhibition (HI) test provided a positive linear correlation between both tests (Pearson's product-moment correlation; $r = 0.652$; $P < 0.001$). However, a discrepancy of test results was evident in weeks 7 and 10, with 10 sera of vaccinated birds evaluated negative by HI test but positive by ELISA. Eight of these sera were confirmed to yield avian paramyxovirus specific reactivity by western blot analysis. Relative diagnostic sensitivity and specificity were determined to

be 100.0% and 91.7% for the ELISA, compared with 91.1% and 97.2% for the HI test. Thus, the established ELISA represents a suitable alternative to the HI test in the monitoring of the immune response of waterfowl after vaccination, particularly for the analysis of high sample numbers. Further on, the results emphasize the immunogenicity of the inactivated Newcastle disease virus vaccine in domestic geese and Muscovy ducks.

3.2.2 Introduction

Newcastle disease (ND) is one of the most important viral diseases of commercial poultry. The highly contagious character and fatal course with subsequent restrictions on trade result in an enormous economic impact on the poultry industry worldwide. The infectious agent, avian paramyxovirus serotype (APMV)-1, belongs to the genus *Avulavirus* of the subfamily *Paramyxovirinae* in the family *Paramyxoviridae* (Lamb *et al.*, 2005). Apart from APMV-1, other serotypes (APMV-2 to APMV-9) are described but are of minor importance.

Clinical manifestation of APMV-1 infection is highly variable, ranging from inapparent infection to severe disease with high morbidity and mortality. Whereas chickens and turkeys are highly susceptible to the clinical disease, waterfowl is known to usually overcome infection even with highly virulent APMV-1 strains, without showing any symptoms (Bolte *et al.*, 2001; Alexander, 2003).

Although birds like geese and ducks are considered more resistant, they bear the risk to harbour and shed APMV-1 for a prolonged period of time (Winmill & Haig, 1961; Vickers & Hanson, 1982) and velogenic Newcastle disease virus (NDV) could be transmitted to chickens, put into contact with infected geese or with their droppings (Wan *et al.*, 2004).

In addition, ND outbreaks affecting geese in China are reported and a “goose” strain induced disease in experimentally infected geese, with clinical signs like depression, anorexia, white diarrhoea, ocular or nasal discharges and deaths after variable periods of time (Wan *et al.*, 2004).

Possible preventive measures to reduce the risk of transmission of APMV-1 from inapparently infected geese and ducks to more susceptible domestic birds may include, next to indispensable biosecurity measures, vaccination of domestic waterfowl. Immunization of commercial meat-type geese by conjunctival route, with a live La Sota type vaccine,

indicated that geese do not readily respond to vaccination with live lentogenic strains (Bolte *et al.*, 2001). However, application of an inactivated oil emulsion NDV vaccine, alone or 10 weeks after initial immunization with the live vaccine, ameliorated intensity and duration of antibody response. Immunogenicity of an inactivated La Sota vaccine in geese is corroborated by a recent vaccination study (Dai *et al.*, 2008), which demonstrated complete protection 21 days but not 140 days after immunization. In this study the best results, concerning immune response and duration of protection, were achieved using live La Sota vaccine priming, followed by a booster vaccination with a mesogenic strain (Muktsewar) 2 to 3 weeks later. Next to an efficient vaccine or vaccination regime, the subsequent control of the immunization programme with a suitable test system is of fundamental importance. The haemagglutination inhibition (HI) test, used as a current serological standard test in waterfowl, is laborious and relatively subjective in its evaluation. Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), in contrast, as commercially available for chickens and turkeys (Office International des Epizooties, 2008), can be standardized more easily, have the advantage of a possible high degree of automation concerning the operation and evaluation process, and are thus suitable for a high sample throughput.

The aim of this study was to evaluate an indirect NDV ELISA for waterfowl (Kothlow *et al.*, 2008), concerning its potency in comparison with the HI test as conventional standard test method as well as its suitability to monitor the antibody response after vaccination.

3.2.3 Materials and Methods

Sera. APMV-1-positive waterfowl sera were derived from immunized adult Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and adult domestic geese (*Anser anser var. domestica*) that received an inactivated APMV-1 vaccine for chickens (Nobilis Newcavac[®]) subcutaneously. Depending on the dosage, ducks as well as geese were divided into two groups. The first group of nine ducks and 11 geese was immunized with the single chicken dose (0.5 ml; 1×), the second one of nine ducks and seven geese with the two-fold chicken dose (1.0 ml; 2×) at the start of the trials. Sera obtained before immunization and at the indicated time points after vaccination were stored at -20°C. They were initially tested by HI test and ELISA. All questionable sera (i.e. sera with positive reactivity before vaccination as well as sera from vaccinated birds

with negative or differing results in HI test and ELISA) were additionally analysed by western blot. Only those samples that yielded a sufficient amount of serum for the performance of all tests were included in analysis of the test systems. Therefore, the numbers of sera can vary in part between the different time points of sampling.

Enzyme-linked immunosorbent assay. The ELISA was performed as described previously (Kothlow *et al.*, 2008). All sera of the immunization study were tested in parallel. Briefly, Polysorp Immuno Plates (Nunc) coated with sucrose step-gradient purified antigen of APMV-1 strain La Sota (5 µg/ml) (Lamontagne *et al.*, 1975) were incubated for 30 minutes with the test sera, diluted 1:200 in blocking buffer. To reduce non-specific binding, test sera were pre-treated with negative chicken embryo amnio-allantoic fluid for 1 h at room temperature, before they were added to the wells. After removal of the test sera and three successive washing steps, monoclonal antibody 14A3, directed against the duck immunoglobulin light chain (Kothlow *et al.*, 2005), was added (1:10 in blocking buffer). Incubation took place at room temperature for 30 min. Plates were washed again and horseradish peroxidase-conjugated goat-anti-mouse immunoglobulin (Ig)-specific polyclonal antibodies (Sigma) (1:250 in blocking buffer) were added for half an hour. Subsequent to the washing procedure, plates were incubated in darkness with the substrate (*ortho*-phenyldiamidihydrochloride; Sigma) (1 mg/ml) in citrate buffer, containing 0.15% v/v hydrogen peroxide. The reaction was stopped after 10 min with sulphuric acid (2M) and optical density (OD) was measured at 490 nm. For the evaluation of the ELISA the cut-off point was defined as the arithmetic mean of the OD of all sera taken before vaccination, plus the threefold standard deviation.

Haemagglutination inhibition test. The HI test was performed according to standard protocols (Office International des Epizooties, 2008). Titres are defined as the highest serum dilution that inhibited haemagglutination, and are expressed as \log_2 of the reciprocal values. HI end-points of four or greater were considered positive.

Western blot analysis. Sucrose step-gradient purified APMV-1 antigen was subjected to 10% glycine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (Laemmli, 1970) using a preparative comb of a minigel system (Perfect Blue,

10x10 cm; Peqlab, Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany) with 1.67 µg purified APMV-1 antigen/mm running front of the gel. Subsequently proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) by semi-dry blotting. Membranes were blocked for 60 min with 2% w/v skim milk in phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% Tween 20, cut into stripes (2 to 3 mm) and stored at -20°C until their utilization. Test sera were pre-incubated for 1 h with negative chicken embryo amnio-allantoic fluid in a dilution of 1:2, to diminish unspecific reactivity, centrifuged for 10 min at 6077 ×g (Heraeus Biofuge pico, rotor 3325 B) and then brought to a final dilution of 1:1000 with TBST buffer (Tris-buffered saline, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.1% Tween 20) plus 3% skim milk (TBST-M buffer). Nitrocellulose strips were then incubated overnight with the diluted test sera at 4°C, on a shaker. After three 5-min washes with TBST buffer, monoclonal antibody 14A3 cell culture supernatant was added at a dilution of 1:100 in TBST-M buffer. Following 30 min of incubation at room temperature on a shaker and three subsequent washing steps, strips were covered with horseradish peroxidase-conjugated goat-anti-mouse Ig-specific polyclonal antibodies (Sigma), at a dilution of 1:5000 in TBST-M buffer. They were incubated for another 30 min at room temperature under agitation. After three further washing steps, membranes were finally covered for 5 min with a horseradish peroxidase substrate (ECL plus Western Blotting Detection System; Amersham Biosciences) and the reaction was visualized by autoradiography on a medical X-ray film (AGFA Curix HT 1.000 G+).

Statistical evaluation. The relative diagnostic sensitivity (rDSe) and relative diagnostic specificity (rDSp) of the established ELISA in comparison with different reference tests and the vaccination status were calculated following standard procedures (Miller *et al.*, 1991). Statistical calculations and diagrams were designed using R project, a free software environment for statistical computing and graphics (www.r-project.org). To determine the significance of correlation, the Pearson's product-moment correlation coefficient was used. To test the significance of differences between the ELISA and the HI test, the Wilcoxon rank-sum test was performed (Sachs, 2004). HI titres smaller than two are, for the sake of completeness, contained only as virtual values ($\log_2 = 0.5$) later in Figures 1 and 3. They are not taken into account for regression and are not included in the evaluation of the significance of correlation and the significance of differences between ELISA and HI test. The

level of significance ($\alpha = 0.05$) was corrected, when necessary, with the help of the Bonferroni correction, and in the following is given behind the calculated P value.

Blood samples taken from ducks before application of the 1× vaccine dose were used for the 1× as well as the 2× dosage group, to evaluate the differences in reactivity between sera taken before and after vaccination.

The sample size, necessary to determine the success of vaccination in a flock, was estimated with the help of Win Episcopo 2.0 (<http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscopo/>).

3.2.4 Results

Test sera were derived from adult Muscovy ducks and domestic geese, immunized with either a 1× or 2× chicken dose of an inactivated APMV-1 vaccine. All animals tested negative before vaccination by the HI test (Figure 1b and 1d). By ELISA, one serum lay marginally above the cut-off point (Figure 1a). Three weeks after vaccination, birds of both dosage groups exhibited an APMV-specific antibody response, detected by HI test (Figure 1b and 1d) as well as ELISA (Figure 1a and 1c). The APMV-specific reactivity was still evident 7 and 10 weeks after immunization. Concerning the ELISA values, significant differences between sera taken before vaccination and those taken 3, 7 and 10 weeks thereafter were calculated (Wilcoxon rank-sum test; highest P value of all tests ≤ 0.0021 ; $\alpha = 0.0083$).

In the group receiving the 1× chicken dosage, the highest median of the HI titres was obtained 3 weeks after immunization for geese as well as ducks, and then decreased continuously 7 weeks and 10 weeks after vaccination (Figure 1b). Three, 7 and 10 weeks post vaccination, 89.5% ($n = 17/19$), 73.7% ($n = 14/19$) and 66.7% ($n = 12/18$), respectively, of birds vaccinated with the 1× chicken dosage were identified NDV-positive by HI test.

By ELISA, the median of the initial antibody reactivity, 3 weeks after immunization with the 1× chicken dose, seemed weak compared with later time points (Figure 1a). Nevertheless, 84.2% of the vaccinated birds ($n = 16/19$) were determined APMV-positive at that time. The highest median of the ELISA-reactivity was obtained 7 weeks after vaccination, with 94.7% positive reactants ($n = 18/19$), but declined 10 weeks after immunization, when 83.3% ($n = 15/18$) of vaccinated birds were detected ELISA-positive.

In the group receiving the 2× chicken dosage, visible HI and ELISA reactivity was measured 3 weeks after vaccination, but had dropped 7 weeks after immunization. However, in both domestic geese and Muscovy ducks, a second increase in antibody response became evident 10 weeks after vaccination. Three weeks after immunization the HI test identified 93.8% ($n = 15/16$) of the vaccinated birds APMV-positive. The same birds were seropositive by ELISA. Seven weeks after vaccination 78.6% of the animals were tested positive by HI test ($n = 11/14$), while the ELISA identified 100.0% as positive ($n = 14/14$). At the time of the second increase in antibody response, 10 weeks after immunization, both tests achieved positive results in 100.0% (14 out of 14) of vaccinated birds. At that time point, the highest median of HI titres as well as ELISA OD values was measured. Statistical evaluation revealed that, for geese, the increase in antibody response 10 weeks after immunization was significant by HI test (Wilcoxon rank-sum test; $P \leq 0.0019$; $Is = 0.01666$) as well as by ELISA (Wilcoxon rank-sum test; $P = 0.00058$; $Is = 0.0083$); whereas for ducks the increase was only significant by HI test and only from week 7 to week 10 (Wilcoxon rank-sum test; $P = 0.002$; $Is = 0.01666$). Statistical comparison of each of the three time points after vaccination between the two dosage groups revealed that the antibody response 10 weeks after vaccination for both the ELISA as well as the HI test was significantly higher in the 2× dosage group (Wilcoxon rank-sum test; $P \leq 0.0041$; $Is = 0.05$).

Testing repeatability of the ELISA, using the same sera under the same working conditions, provided comparable results (Figure 2). Statistical evaluation by calculation of the correlation coefficient “ r ” and the P revealed a positive linear correlation (r) of 0.982 (Pearson’s product-moment correlation; $P < 0.001$; $Is = 0.05$).

Comparison of ELISA reactivity and HI titres (Figure 3) also proved a positive linear correlation of the established ELISA with the HI test as the current serological standard test (Pearson’s product-moment correlation; $r = 0.652$; p -value < 0.001 ; $Is = 0.05$). Similar correlations could be determined when statistical analysis was performed separately for sera of the different time points after vaccination (Pearson’s product-moment correlation; week 3: $r = 0.619$; $P < 0.001$; week 7: $r = 0.774$; $P < 0.001$; week 10: $r = 0.699$; $P < 0.001$). Striking was the observation that sera with the same HI titre yielded different ELISA values. For example, several sera collected 7 weeks after vaccination, with an HI titre of seven, varied by their ELISA OD values between 0.74 and 2.03 (Figure 3). Analysing these sera by western blotting confirmed APMV-specific reactivity (Figure 4). In accordance with the ELISA results,

the sera showed differences, concerning the strength and pattern of proteins recognized. Especially, sera with high ELISA-reactivity resulted in stronger bands and additional reactivity with the matrix protein (M).

To determine efficacy of the ELISA to monitor the antibody response, the results were compared in more detail with those of the HI test, as the serological standard test (Table 1). Using the HI test as the reference resulted in a rDSe of 98.8% and a rDSp of 74.4% for the ELISA. Analysed separately for the different time points, the rDSe was continuously 100.0%, with the exception of week 3 after immunization (96.9%), when one of the 32 HI-test-positive sera was evaluated negative by ELISA. The rDSp was 96.2% before vaccination and 100.0% 3 weeks thereafter, but poor in week 7 (12.5%) and 10 (50.0%) following immunization, when a total of 10 sera was determined positive only by ELISA. However, western blot analysis verified APMV-specific antibodies in eight of these 10 sera. Therefore, all questionable sera were additionally analysed by western blot, and the rDSe as well as the rDSp of the ELISA and the HI test were subsequently determined, using the HI test in combination with the western blot results as reference (Table 1). In this calculation, the ELISA yielded a higher rDSe (100.0%) than the HI test (91.1%), with most abundant differences at weeks 7 and 10 after vaccination. Concerning the rDSp, the HI test was overall more specific (ELISA, 91.7%; HI test, 97.2%). The rDSp of the ELISA was particularly weak 7 weeks after vaccination, when two of three western blot negative sera yielded a false-positive reactivity in the ELISA. However, in weeks 3 and 10 the ELISA reached with 100.0% an equal or even higher specificity than the HI test. Furthermore, it is interesting that seven sera from vaccinated birds were negative by HI test, ELISA and western blot analysis. Therefore, statistical evaluation of the results on the basis of the vaccination status was done, assuming that after successful ND vaccination all birds should be APMV-positive (Table 1). This evaluation provided a higher diagnostic sensitivity for the ELISA (92.2%) than for the HI test (83.0%). Calculated separately for the different time points, the diagnostic sensitivity of the ELISA was lowest in week 3, that of the HI test in weeks 7 and 10 after vaccination. Concerning the diagnostic specificity, the HI test surpassed the ELISA with 100.0% compared to 96.2%.

3.2.5 Discussion

In this study, an indirect whole virus ELISA for waterfowl was evaluated, concerning its potency in comparison with the HI test as the conventional test method and its suitability to monitor the antibody response of domestic geese and Muscovy ducks after immunization with an APMV-1 vaccine.

Statistical comparison of ELISA results with those of the HI test, performed in parallel, provided a positive linear correlation between both tests. However, in the course of seroconversion some differences became evident, especially within the 1× dosage group. Here the highest median of the HI titres is already reached 3 weeks after vaccination, whereas ELISA results provide a more moderate increase, with the highest median determined 7 weeks after immunization. A similar time-dependent discrepancy between the HI test and ELISA has been observed for the detection of antibodies to a haemagglutinating duck adenovirus (Duck adenovirus 1) in chickens (Piela & Yates, 1983): while all hens developed significant HI antibody titres already 7 days after inoculation, they were negative by an indirect ELISA at that time. It was suggested that this phenomenon was due to different test methods: IgG as well as IgM, which dominates the first 2 weeks of a primary immune response, are able to agglutinate viral particles (Keller, 1994; Kuby, 1997) and therefore are likely to be measured by the HI test. The ELISA of the above study, however, was limited to the detection of IgY, the functional equivalent to mammalian IgG. As the monoclonal antibody 14A3, directed against the light chain of anatid serum IgY, is capable to detect IgY, IgA and presumably also binds to IgM (Kothlow *et al.*, 2005), the above explanation is unlikely for the established NDV ELISA for waterfowl.

However, the different test methods of HI test and ELISA imply that antibodies to different antigenic determinants of the virus are measured in each assay. While the former test specifically detects antibodies directed against epitopes of the haemagglutinin neuraminidase protein of APMV-1 (Kaleta, 1992), the ELISA measures a broad spectrum of antibodies specific for different viral proteins (Charan *et al.*, 1981; Snyder *et al.*, 1983). The onset and amount of antibody production against the different proteins of NDV might vary with the time after vaccination. For example, this phenomenon is known for hepatitis C virus and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infections: antibody responses to non-structural proteins of hepatitis C virus were detected earlier and were of greater magnitude

than those to structural proteins (Netski *et al.*, 2005). In infections with BRSV, the G antibody titres declined significantly more rapidly than the F antibody titres (Schrijver *et al.*, 1996). Therefore, referring to our study, positive NDV ELISA values at a time point, when none or only a low HI titre is measured, can indicate the single or dominating presence of antibodies directed against viral proteins other than the haemagglutinin neuraminidase protein. This consideration is corroborated by western blot analysis. Eight of 10 ELISA-positive but HI-test-negative and therefore questionable sera from weeks 7 and 10 after vaccination could be verified APMV-positive by western blot analysis, whereas the single HI-test-positive but ELISA-negative serum of a vaccinated goose was determined negative. In addition, western blot analysis revealed that even sera taken at the same time point after vaccination, from different individuals, can show variations in virus protein specific antibody pattern. This phenomenon points to the collateral occurrence of individual variations in the antibody pattern or the antibody kinetic. Differences in decline of antibody titres in individual animals are also mentioned for BRSV (Schrijver *et al.*, 1996).

Thus, our study indicates that time-dependent dominance of antibodies against different viral proteins may be of diagnostic relevance. The western blot analysis proves that differences in the antibody pattern lead to a greater number of false-negative results in the HI test than in the ELISA. Especially at later time points after virus contact, the ELISA provides a higher detection level than the HI test, which is advantageous in surveillance programmes. Several other working groups suggested that the ELISA detects more NDV seroreactants than the HI test (Snyder *et al.*, 1983; Hlinak *et al.*, 1992), implying that the immunoassay has a higher methodical sensitivity in the detection of NDV-specific antibodies.

The rDSe and rDSp calculated in our study taking the vaccination status or, instead of the HI test alone, a combination of HI test and western blot as reference reflect these facts and underline the effect of early and late immune reaction on the efficiency and correlation of the ELISA and HI test. In a former study, subsequent to a comparative evaluation of the ELISA and HI test to detect immunity against measles virus, it was concluded that the HI test should not be used as a reference method for evaluation of the sensitivity of ELISA IgG kits, because of the different antigenic determinants of the virus involved in each assay (Duvdevani *et al.*, 1996). The rDSp of the established NDV ELISA for ducks and geese in both cases lay under that of the HI test, but reached 91.7% taking HI test and western blot as reference.

The overall aim of this study was to analyse the suitability of the ELISA, to monitor the antibody response of domestic geese and Muscovy ducks after subcutaneous immunization with an inactivated APMV-1 vaccine for chicken, administered in two different doses. Results indicate that the established ELISA distinguishes clearly and in a reproducible manner between sera of vaccinated and non-vaccinated birds. In total, 96.2% of the birds were tested APMV seronegative by ELISA before vaccination and 92.2% of birds were determined APMV seropositive after vaccination. ELISA evaluation demonstrates that the inactivated APMV-1 vaccine for chicken induces a measurable antibody response in domestic geese and Muscovy ducks. Seroconversion became evident 3 weeks post vaccination in both dosage groups and persisted until week 10 after immunization. These results confirm the good immunogenicity of inactivated NDV vaccines not only in domestic geese, as already described (Bolte *et al.*, 2001), but also in Muscovy ducks. Moreover, the humoral immune response was stronger and longer lasting in domestic geese and Muscovy ducks receiving the 2× chicken dose, with a significantly higher reactivity 10 weeks after vaccination compared with the 1× dosage group. In addition, the majority of non-responders (six out of seven) and a higher number of sera with no HI titre and low ELISA-reactivity (seven out of ten) were found in the 1× dosage group (Figure 3). Considering these facts, it is recommendable to immunize waterfowl with the two-fold chicken dosage. Nevertheless, vaccine efficacy yet has to be verified by challenge experiments.

All in all, the presented ELISA would allow monitoring the antibody response in geese and ducks after immunization with an inactivated NDV vaccine on a routine basis. Diagnostic sensitivity and specificity as obtained in our study can, in addition, be used for the statistical verification of test regimes. On the basis of a population of 1000 vaccinated birds and a sensitivity of the ELISA of 92.2%, we can propose that with a level of confidence of 95.0% a sample size of 29 birds has to be tested positive, to be certain that the vaccination induced antibodies. For the HI test a sample size of 52 birds would have to be tested positive, due to a correspondent sensitivity of 83.0%. These facts indicate that the established ELISA would be more suitable to give a yes-no answer concerning the humoral immune response after vaccination.

In conclusion, the established ELISA with its high diagnostic sensitivity, especially concerning later time points after vaccination, and its only marginally lower diagnostic specificity, represents an adequate alternative to the HI test, particularly for the analysis of high

numbers of samples from vaccinated geese and ducks. Whether the ELISA may be suitable as a diagnostic test in epidemiological monitoring programmes or not has to be evaluated. In combination with serotyping by the HI test of ELISA seroreactants, this would allow a more detailed analysis of the APMV-1 seroprevalence in waterfowl.

3.2.6 Acknowledgements

The authors thank Andreas Fröhlich (FLI, Wusterhausen) for his support concerning the statistical evaluation of our results and Timm Harder for proofreading the manuscript.

3.2.7 References

Alexander, D.J. (2003). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry*, 11th 10 edn (pp. 63-99). Ames: Iowa State Press.

Bolte, A.L., Voss, M., Vielitz, E. & Kaleta, E.F. (2001). Response of domestic geese to lentogenic and velogenic strains of Newcastle disease virus. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108, 155-159.

Charan, S., Rai, A. & Mahajan, V.M. (1981). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of Newcastle disease virus antibodies in human sera. *Journal of Clinical Pathology*, 34, 90-92.

Dai, Y., Liu, M. & Li, W. (2008). Protective efficacy of commercial Newcastle disease vaccines against challenge of goose origin virulent Newcastle disease virus in geese. *Avian Diseases*, 52, 467-471.

Duvdevani, P., Varsano, N., Slepon, R., Lerman, Y., Shohat, T. & Mendelson, E. (1996). Determination of immunity to measles virus in young adults: comparative evaluation of a

commercial enzyme immunoassay and the hemagglutination inhibition techniques. *Clinical and Diagnostic Virology*, 7, 1-6.

Hlinak, A., Dahms, H. & Minning, P. (1992). Beitrag zur Wertung verschiedener Testmethoden zum Nachweis von Antikörpern gegen das Newcastle Disease Virus. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, 47, 443-447.

Kaleta, E.F. (1992). Paramyxovirusinfektionen. In G. Heider & G. Monreal (Eds.), *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels* Band I (pp. 587-661). Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Keller, R. (1994). *Immunologie und Immunpathologie* 4th edn (chapter 8). Stuttgart & New York: Georg Thieme Verlag.

Kothlow, S., Mannes, N.K., Schaerer, B., Rebeski, D.E., Kaspers, B. & Schultz, U. (2005). Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies. *Developmental and Comparative Immunology*, 29, 733-748.

Kothlow, S., Häuslaigner, R., Kaspers, B. & Grund, C. (2008). Evaluation of Newcastle disease virus immunoassays for waterfowl using a monoclonal antibody specific for the duck immunoglobulin light chain. *Avian Pathology*, 37, 323-328.

Kuby, J. (1997). *Immunology* 3rd edn, Part II (chapter 5). New York: W.H. Freeman and Company.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lamb, R.A., Collins, P.L., Kolakofsky, D., Melero, J.A., Nagai, Y., Oldstone, M.B.A., Pringle, C.R. & Rima, B.K. (2005). Family Paramyxoviridae. In C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball (Eds.), *Virus Taxonomy* Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp. 655-668). Amsterdam: Elsevier.

Lamontagne, J.R., Schiller, J.G., Thacore, H.R., Feingold, D.S. & Youngner, J.S. (1975). Infective and noninfective haemagglutinating particles of Newcastle disease virus: Biological and Chemical Characterization. *Journal of Virology*, 16, 1191-1199.

Miller, L.E., Ludke, H.R., Peacock, J.E. & Tomar, R.H. (1991). *Manual of Laboratory Immunology*, 2nd edn. Philadelphia, PA & London: Lea & Febiger.

Netski, D.M., Mosbrugger, T., Depla, E., Maertens, G., Ray, S.C., Hamilton, R.G., Roundtree, S., Thomas, D.L., McKeating, J. & Cox, A. (2005). Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 667-675.

Office International des Epizooties (2008). Newcastle disease. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 6th edn, Vol 1 (pp.576-589). Paris: OIE.

Piela, T.H. & Yates, V.J. (1983). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with hemagglutination-inhibition and immunodiffusion tests for detection of antibodies to a hemagglutinating duck adenovirus in chickens. *Avian Diseases*, 27, 724-730.

Sachs, L. (2004). *Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden*, 11th edn. Berlin: Springer.

Schrijver, R.S., Langedijk, J.P.M., van der Poel, W.H.M., Middel, W.G.J., Kramps, J.A. & van Oirschot, J.T. (1996). Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3, 500-506.

Snyder, D.B., Marquardt, W.W., Mallinson, E.T. & Russek, E. (1983). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. *Avian Diseases*, 27, 161-170.

Vickers, M.L. & Hanson, R.P. (1982). Newcastle disease virus in waterfowl in Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases*, 18, 149-158.

Wan, H., Chen, L., Wu, L. & Liu, X. (2004). Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection. *Avian Pathology*, 33, 216-221.

Winmill, A.J. & Haig, D.A. (1961). Observations on Newcastle disease in Kenya. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 9, 365-369.

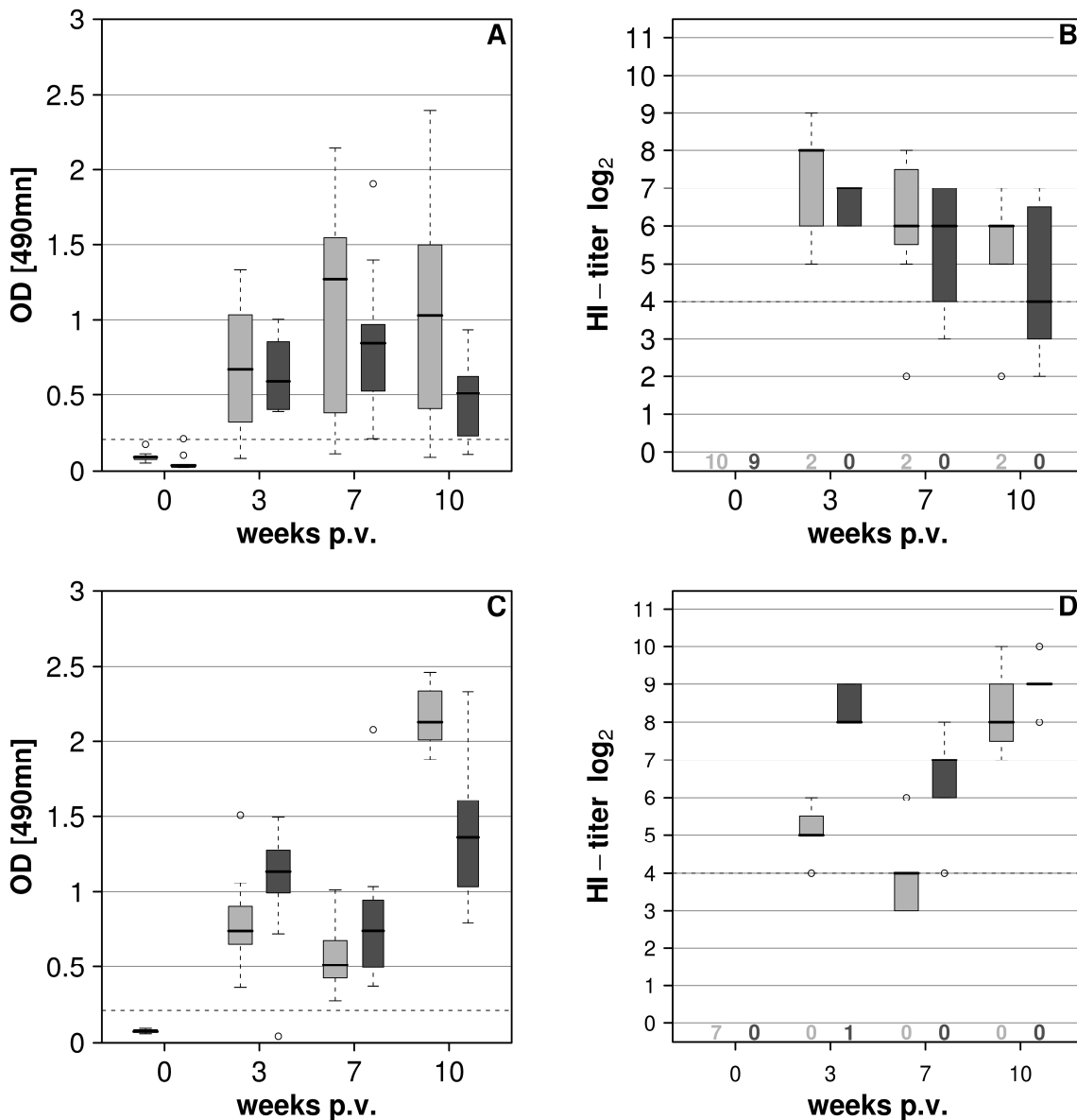


Figure 1. Antibody response of ducks and geese after ND vaccination. Sera from domestic geese and Muscovy ducks, taken at different time points after immunization with an APMV-1 vaccine, were tested in parallel by (1a, 1c) ELISA and (1b, 1d) HI test. Shown are the results of geese (grey shading) and ducks (black shading) vaccinated with (1a, 1b) a single or (1c, 1d) a two-fold chicken dose. The box plot evaluation provides the median (bolded line), the lower and upper hinges (25% and 75% quartile, respectively), the extreme of lower and upper whiskers, as well as the outliers (○). The number of HI log₂ titres smaller than 2, at the different time points, is mapped above the x axis. Dashed lines, thresholds for the tests (HI-titre > 4, ELISA-OD > 0.207).

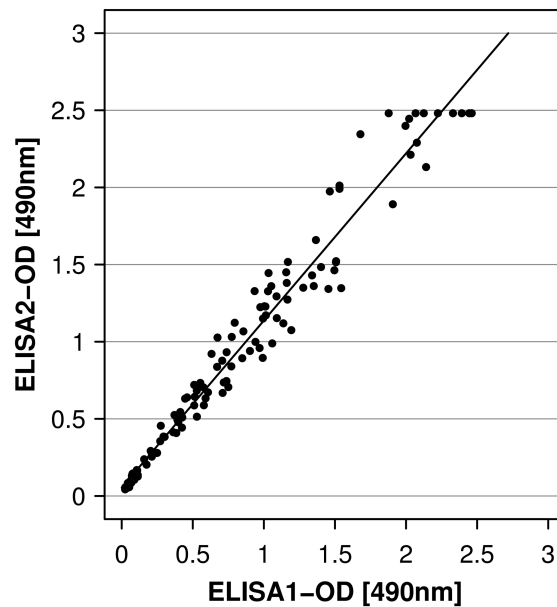


Figure 2. *Repeatability of the APMV ELISA. Sera from domestic geese and Muscovy ducks, immunized with an APMV-1 vaccine for chickens, were analysed by ELISA twice, under the same working conditions. Sera of both dosage groups and all sample dates are included. Shown is the comparison of the obtained OD values by regression.*

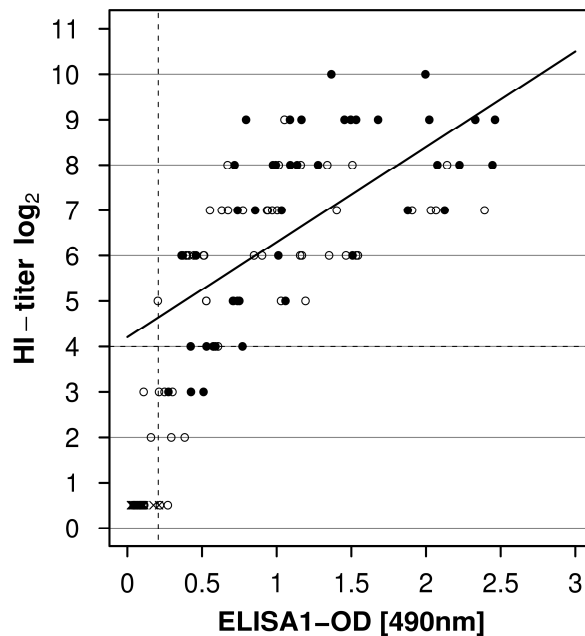


Figure 3. Correlation of ELISA and HI test results. Sera of adult domestic geese and Muscovy ducks from an immunization study with an APMV-1 vaccine for chickens were analysed in parallel by ELISA and HI test. The diagram includes sera obtained at the day of vaccination (x) as well as 3, 7 and 10 weeks thereafter, from animals immunized with the single (0,5 ml; ○) and the twofold (1,0 ml; ●) chicken dose, respectively. Sera with HI titres smaller than one are, for the sake of completeness, included as virtual values ($\log_2 = 0.5$), but are not taken into account for the correlation. Dashed lines, thresholds for the tests.

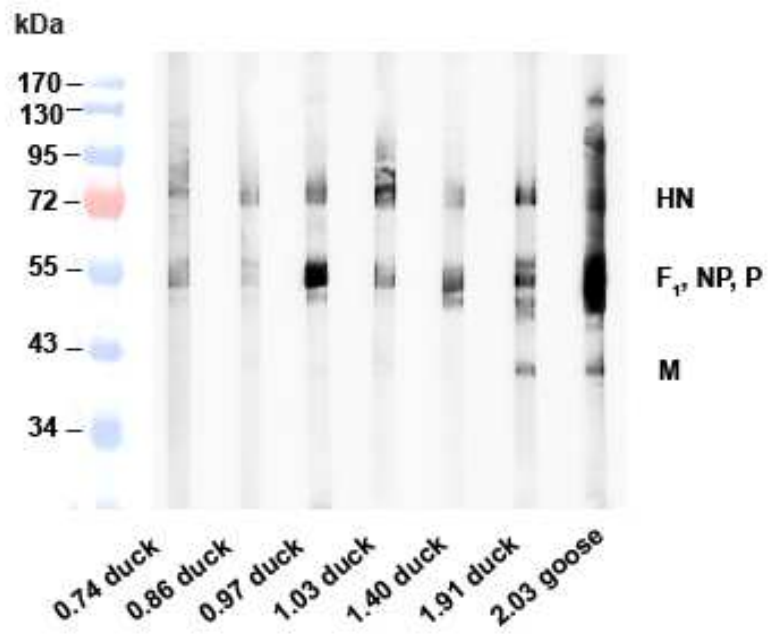


Figure 4. Western blot analysis of sera with the same HI titre but different ELISA reactivity. Seven sera taken 7 weeks after vaccination with an HI titre of seven but differing ELISA reactivity were investigated by western blot analysis. Reactivity is shown after an exposure time of 10 sec. (HN, haemagglutinin-neuraminidase; P, phosphoprotein; NP, nucleoprotein; F₁, fusion protein 1; M, matrix protein).

Tabel 1. *Statistical parameters calculated by taking the HI test, the HI test and western blot (WB), or the vaccination status as the reference standard*

	weeks post vaccination											
	0 n ^a = 26		3 n = 35		7 n = 33		10 n = 32		Total n = 126			
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
ELISA	1 ^b	25	31	4 ^b	32	1 ^b	29	3 ^b	93	33		
HI-test	0	26	32	3 ^b	25	8 ^b	26	6 ^b	83	43		
WB	0	26	31	4	30	3	29	3	90	36		
HI-test as standard:												
ELISA												
Sensitivity		100.0%		96.9%		100.0%		100.0%		98.8%		
Specificity		96.2%		100.0%		12.5%		50.0%		74.4%		
HI test and WB as standard:												
ELISA												
Sensitivity		100.0%		100.0%		100.0%		100.0%		100.0%		
Specificity		96.2%		100.0%		33.3%		100.0%		91.7%		
HI-test												
Sensitivity		100.0%		100.0%		83.3%		89.7%		91.1%		
Specificity		100.0%		75.0%		100.0%		100.0%		97.2%		
Vaccination status as standard:												
ELISA												
Sensitivity				88.6%		97.0%		90.6%		92.2%		
Specificity		96.2%								96.2%		
HI-test												
Sensitivity				91.4%		75.8%		81.3%		83.0%		
Specificity		100.0%								100.0%		

^an = number of birds tested

^bsera verified by WB analysis

4 ERWEITERTE DISKUSSION

Ziel der Studie war es, die serologischen Untersuchungsmöglichkeiten beim Wassergeflügel durch einen indirekten ELISA zu erweitern. Dazu war es in einer ersten Phase erforderlich, einen in Mäusen hergestellten, gegen die leichte Kette von Pekingtonen-Immunglobulin gerichteten monoklonalen Antikörper (mAk 14A3) auf seine Funktionalität hin zu analysieren. Dies betraf einerseits die Erfassung seiner Fähigkeit zur Kreuzreaktivität mit Immunglobulin (Ig) auch anderer Wassergeflügelspezies als Pekingtonen, andererseits die Abklärung seiner Eignung als Bestandteil einer Antikörperkaskade und somit seiner Verwendbarkeit in verschiedenen Immunassays. In einer zweiten Phase erfolgte dann die Etablierung eines indirekten ELISA für das Wassergeflügel zum Nachweis von Antikörpern gegen APMV, die Bewertung seiner Effizienz, unter anderem im Vergleich mit dem HAH als serologischem Standardtest, sowie seiner Eignung zur Überwachung der Antikörperantwort von Gänsen und Enten nach Impfung mit einem inaktivierten ND-Impfstoff für Hühner. Letzteres ermöglichte zugleich eine grobe Einschätzung der Wirksamkeit dieser Vakzine beim Wassergeflügel. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden zwei Publikationen verfasst und von der Zeitschrift *Avian Pathology* angenommen. Bei der ersten Veröffentlichung handelt es sich um eine „combined first-authorship“- (Kothlow *et al.*, 2008) und bei der zweiten um eine Erstautor-Publikation (Häuslaigner *et al.*, 2009).

4.1 Funktionalität des Antispezies-Antikörpers

Für die Etablierung eines indirekten ELISA unerlässlich ist ein gegen Serum-Igs der zu untersuchenden Spezies gerichteter Antikörper. In der vorliegenden Studie wurde ein monoklonaler Antikörper (mAk 14A3) verwendet, der gegen die leichte Kette von Pekingtonen-Ig gerichtet ist (Kothlow *et al.*, 2005) und gegenüber polyklonalen Seren wesentliche Vorteile bietet. Sorgfältig ausgewählte monoklonale Antikörper reagieren im Vergleich zu polyklonalen Seren nicht nur spezifischer, sie zeichnen sich in der Regel auch durch eine besonders hohe Affinität bzw. Avidität zum entsprechenden Antigen, im vorliegenden Fall der leichten Kette des Serum-Ig von Pekingtonen, aus. Neben der Detektierbarkeit des verwendeten Substrates stellt die Stärke der Antigen-Antikörper-

Interaktionen einen wichtigen limitierenden Faktor für die Sensitivität von Immunassays dar (Avrameas, 1983). Der Einsatz des mAk 14A3 anstelle eines polyklonalen Antispezies-Antikörpers sollte deshalb nicht nur eine Reduktion der unspezifischen Hintergrundreaktivität und damit der Zahl falsch positiver Ergebnisse bewirken, sondern außerdem auch einen positiven Effekt auf die Sensitivität des Tests haben. Ein weiterer wesentlicher Vorteil monoklonaler Antikörper ist, ungeachtet der relativ aufwändigen initialen Herstellung, ihre leichte Nachproduktion und die in der Regel hohe Identität zwischen den einzelnen Chargen (Cook & Self, 1995). Ein einschränkender Faktor ist die Tatsache, dass das von monoklonalen Antispezies-Antikörpern erfasste Artenspektrum mehr oder weniger begrenzt ist. In einem ersten Schritt galt es deshalb, die Kreuzreaktivität von mAk 14A3 mit Serum-IgS diverser Wassergeflügelsspezies, insbesondere mit Igs der für die Etablierung des ELISAs verwendeten Hausgänse und Moschusenten zu eruieren.

In der WB-Analyse wies mAk 14A3 eine breite Kreuzreaktivität mit Igs diverser Entenarten sowie Gänsen und Schwänen auf. Kreuzreaktivitäten von gegen Igs bestimmter Spezies gerichteten Antikörperpräparationen mit Igs anderer Spezies wurden bereits in früheren Untersuchungen beobachtet (s. Veröffentlichung 1). Mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten WB konnte zusätzlich eine genaue Aussage über das Molekulargewicht (MG) der von dem Antikörper detektierten Proteine und damit eine sicherere und exaktere Eingrenzung seines Reaktionsspektrums erzielt werden. Für alle im Rahmen dieser Studie untersuchten Wassergeflügelsspezies konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kothlow und Mitautoren (2005) gezeigt werden, dass der mAk 14A3 spezifisch mit Proteinen im MG-Bereich von 25 kDa reagiert. Nach Ng und Higgins (1986) sowie Zimmermann und Mitautoren (1971) beträgt das MG der leichten Ketten von IgY und IgM bei Enten 22 bis 25 kDa. Nach dem MG zu urteilen, handelt es sich folglich um eine spezifische Reaktivität des mAk 14A3 mit der leichten Kette der Serum-IgS der getesteten Wassergeflügelsspezies.

Die in der vorliegenden Studie festgestellten Unterschiede in der Kreuzreaktivität des mAk 14A3 mit der leichten Kette der Igs diverser Wassergeflügelsspezies sind vermutlich eher auf individuelle Schwankungen in der Ig-Konzentration der Seren zurückzuführen als auf, die Detektierbarkeit durch den mAk beeinflussende, phylogenetische Unterschiede (Veröffentlichung 1). Eine definitive Abklärung dieser Frage würde die Angleichung des Ig-

Gehalts der Seren mit anschließender Testung der Kreuzreaktivität des mAk im Rahmen einer Titration erfordern. Untersuchungen dieser Art waren jedoch nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit. Von entscheidender Bedeutung war vielmehr die Tatsache, dass sich der mAk 14A3 in verschiedenen Testverfahren gut zum Nachweis von Antikörpern gegen NDV, nicht nur in Seren von Pekingenten, sondern auch in solchen anderer wirtschaftlich genutzter Wassergeflügelarten, wie Moschusenten und Hausgänsen, eignet. Für letztere hat sich der monoklonale Antispezies-Antikörper gut bewährt. Im Rahmen des Nachweises von Anti-NDV-Antikörpern im Serum dieser Spezies zeigt er sowohl im IF-Test als auch im ELISA eine gute Funktionalität. Er ermöglicht ferner eine klare Differenzierung zwischen Seren geimpfter und ungeimpfter Tiere. Die Spezifität dieser Reaktivität konnte über die WB-Analyse bestätigt werden. Die Sensitivität des Antikörpers für Seren weiterer Spezies wäre in den jeweiligen Testsystemen zu bestimmen.

Da der vorliegende Anti-Pekingenten-Antikörper nicht selbst konjugiert ist, war der Einsatz eines zusätzlichen, in diesem Fall gegen Mäuse-IgG gerichteten, markierten Antikörpers erforderlich. Dies könnte durch eine direkte Markierung des mAk 14A3 umgangen werden und somit durch den Wegfall eines Arbeitsschrittes, sowohl Zeit als auch Kosten eingespart werden. Insbesondere für die Routinediagnostik wäre das von großem Vorteil. Aber auch die in dieser Studie gewählte komplexere Antikörperkaskade hat ihre Vorzüge. Sie bewirkt einen nicht zu vernachlässigenden Signalverstärkungseffekt und damit eine höhere methodische Sensitivität des Testsystems. An ein Antikörpermolekül in der Probe binden in der Regel mehr als ein Antispezies-Antikörper und an diesen wiederum mehrere konjugierte Antikörper, wodurch es in der Antikörperkaskade von Stufe zu Stufe zu einer Erhöhung der Antikörperzahl und somit am Ende zu einer vergleichbar höheren enzymatischen Aktivität kommt (Luttmann *et al.*, 2006). Das hat zur Folge, dass auch geringere Mengen in der Probe enthaltener Antikörper noch ein detektierbares Signal hervorrufen können. Zudem wird der aufwändige Schritt der Enzymmarkierung umgangen, da konjugierte Anti-Maus-Antikörper kommerziell erhältlich sind.

4.2 Effizienz des etablierten indirekten Newcastle Disease-ELISA und seine Eignung zur Überprüfung der Antikörper-Antwort beim Wassergeflügel nach Impfung

Mit dem, unter Einsatz des monoklonalen Anti-Pekingenten-Antikörpers entwickelten indirekten ND-ELISA für das Wassergeflügel war bei den untersuchten Seren gegen ND geimpfter Tiere bereits drei Wochen post vaccinationem (p.v.) eine deutliche Antikörper-Antwort messbar. Der ELISA erwies sich als sehr geeignet, zwischen geimpften und ungeimpften Hausgänsen und Moschusenten zu differenzieren. Der Unterschied zwischen den ELISA-Werten für 0-Blut-Seren und für die, zu den einzelnen Beprobungszeitpunkten nach Vakzination gewonnenen Seren ist signifikant. Im Unterschied zu anderen Studien, in denen der ELISA für den Nachweis der Serokonversion nach Vakzination zum Einsatz kam, konnte in der vorliegenden Untersuchung darüber hinaus die Richtigkeit der ELISA-Reaktivität anhand des WB überprüft werden. Mit diesem aufgrund seines Testprinzips sowohl sensitiven als auch spezifischen Testsystem konnte eindeutig gezeigt werden, dass der etablierte ELISA durchgehend richtig negative Ergebnisse lieferte und nur ein Serum eines nicht geimpften sowie zwei Seren geimpfter Tiere falsch positiv bewertete. Der ELISA zeigte ferner eine gute Wiederholbarkeit mit positiver linearer Korrelation der Ergebnisse.

Mit dem HAH als serologischem Standardtest war ebenfalls eine positive lineare Korrelation festzustellen. Mehrere Arbeitsgruppen haben sich bereits mit der Korrelation von HAH und ELISA im Rahmen des Nachweises von Antikörpern gegen NDV befasst. Alle Studien wiesen eine generelle Korrelation beider Tests nach, wobei die Korrelationskoeffizienten relativ großen Schwankungen unterlagen. Snyder und Mitautoren (1983) bzw. Brown und Mitautoren (1990) errechneten für Seren gegen ND geimpfter Hühner relativ hohe Korrelationskoeffizienten von 0.965 bzw. 0.85 zwischen HAH-Titern und aus einer Standardkurve abgeleiteten ELISA-Titern bzw. ELISA-Werten. Niedrigere, den Ergebnissen der eigenen Studie vergleichbare Koeffizienten zwischen HAH- und ELISA-Titern ermittelten Adair und Mitautoren (1989) für Seren geimpfter sowie infizierter Puten (0.66) bzw. Hühner (0.57). Piela und Yates (1983) sowie Marquardt und Mitautoren (1985) gehen davon aus, dass unterschiedlichste Faktoren, wie Beprobungszeitpunkt, Virusstamm, Virusdosis, Infektions- bzw. Applikationsweg und Empfänglichkeit der Tiere, Auswirkungen auf die

humorale Immunantwort und somit wesentlichen Einfluss auf die Korrelation von ELISA und HAH haben können.

Trotz der positiven linearen Korrelation zwischen HAH und ELISA waren in der vorliegenden Studie, insbesondere in der einfachen Dosisgruppe, Unterschiede zwischen den beiden Testsystemen festzustellen.

Dies betraf zum einen die Anzahl und den Titer positiver Proben: Der ELISA erkannte im Vergleich zum HAH 10 Seren geimpfter Tiere mehr seropositiv und die für ausgewählte Seren im ELISA ermittelten Titer waren überwiegend 10 bis 100mal höher als die entsprechenden HAH-Titer. Diese Ergebnisse sprechen für eine, gegenüber dem HAH höhere analytische Sensitivität des ELISA und stimmen überein mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen (Charan *et al.*, 1981; Snyder *et al.*, 1983; Miers *et al.*, 1983; Arenas *et al.*, 1990; Hlinak *et al.*, 1992a,b, 1998; Cadman *et al.*, 1997). Auch die in diesen Studien zum Nachweis verschiedener Viren bei Vögeln bzw. Menschen eingesetzten indirekten ELISAs erkannten mehr Seren positiv als der HAH. Snyder und Mitautoren (1983) berichten außerdem von im Vergleich zu den HAH-Titern bis zu 160mal höheren ELISA-Titern und schreiben dem ELISA die Fähigkeit zu, geringere Antikörperkonzentrationen als der HAH zu detektieren. Der von Hlinak und Mitautoren (1992a) für Peking- und Moschusenten etablierte indirekte ND-ELISA erkannte mehr als viermal so viele Proben positiv wie der HAH und die für ausgewählte Seren ermittelten ELISA-Titer waren deutlich höher ($\log_2 19,93$) als die entsprechenden HAH-Titer ($\log_2 10,01$).

Eine mögliche Erklärung für die höhere analytische Sensitivität des ELISA ist im Testprinzip von ELISA und HAH an sich zu sehen. Während der HAH ausschließlich gegen das HN-Protein der APMV-1 gerichtete Antikörper erkennt, besitzt der ELISA die Fähigkeit, Antikörper gegen ein breiteres Spektrum antigener Determinanten der APMV zu detektieren. Schwankungen im Antikörpermuster hätten somit auf die mit beiden Tests erzielten Ergebnisse unterschiedliche Auswirkungen. Ein Hinweis für das Vorkommen verschiedener Antikörpermuster in den einzelnen Seren der vorliegenden Studie ist die Tatsache, dass Seren mit ein und demselben HAH-Titer stark in ihren ELISA-Werten variieren. Diese Beobachtungen werden von Berichten anderer Arbeitsgruppen untermauert. Miers und Mitautoren (1983) stellten beim detaillierteren Vergleich einzelner HAH-Titer mit den zugehörigen ELISA-Titern bzw. -Werten fest, dass hohe HAH-Titer zwar mit hohen ELISA-

Medianwerten assoziiert sind, jedoch keine direkte Korrelation zwischen den einzelnen HAH-Titern und zugehörigen ELISA-Werten vorliegt. Adair und Mitautoren (1989) machten ebenfalls die Beobachtung, dass trotz dem generell gleichsinnigen Verhalten von HAH- und ELISA-Titern ein und derselbe HAH-Titer mit einem breiten Spektrum an ELISA-Titern assoziiert sein kann. Wie die eigenen Ergebnisse zeigen, lässt auch die WB-Analyse entsprechende Unterschiede im Bandenmuster der einzelnen Seren erkennen. Schwankungen der ELISA-Werte bei gleichen HAH-Titern spiegeln sich in viruspezifischen Banden unterschiedlicher Zahl und Intensität wider, während die HN-Bande durchweg nur schwach zu sehen ist.

Die schwache Bande im Molekulargewichts-Bereich des HN-Proteins deutet darauf hin, dass die Immunreaktion gegen das HN-Protein vornehmlich gegen konformationsabhängige Epitope gerichtet ist. Im WB unter denaturierenden Bedingungen werden überwiegend lineare Epitope eines Antigens präsentiert, so dass Antikörper gegen die konformationsabhängige Rezeptorbindungsstelle (Crennell *et al.*, 2000; Connaris *et al.*, 2002) nicht binden. Genau diese spezielle Stelle wird im HAH jedoch durch gegebenenfalls vorhandene Antikörper blockiert. Der HAH weist daher konformationsabhängige Antikörper nach. Intermediär stellt sich die Situation für den ELISA dar, bei dem es durch Bindung des Antigens an die Platte zu Veränderungen der Strukturen kommen kann. Dies könnte ein weiterer Grund für auftretende Variationen zwischen HAH und ELISA sein.

Zum anderen waren in der vorliegenden Studie Unterschiede in dem, mittels ELISA bzw. HAH ermittelten Verlauf der Antikörper-Antwort nach Vakzination feststellbar: Nach einer deutlichen Serokonversion drei Wochen p.v. stiegen in der einfachen Dosisgruppe die ELISA-Werte noch bis zur 7. Woche p.v. weiter an, während die HAH-Titer schon wieder abnahmen. Marquardt und Mitautoren (1985) stellten nach Immunisierung von Hühnern mit NDV (Stamm Hitchner B1) vergleichbare Unterschiede im Verlauf von ELISA- und HAH-Ergebnissen fest. Während die HAH-Titer intratracheal immunisierter Hühner nach einem Peak 14 bis 21 Tage p.v. auf niedrige Werte abfielen, hielten die ELISA-Titer bis zum Versuchsende (86 Tage p.v.) das Niveau des Peaks (14 Tage p.v.).

Als mögliche Ursache für die Divergenz der Antikörper-Verläufe zwischen ELISA und HAH könnte ebenfalls der oben erwähnte Unterschied im Testprinzip der beiden Methoden in Frage kommen. Schwankungen in der Zusammensetzung des Antikörpermusters und der

Antikörperkonzentration waren in der vorliegenden Studie mittels WB nicht nur zwischen den Seren einzelner, zum gleichen Zeitpunkt beprobter Individuen (Veröffentlichung 2), sondern auch im zeitlichen Verlauf der Serokonversion (Veröffentlichung 1) feststellbar. Eine weitere bzw. zusätzliche Erklärungsmöglichkeit könnte in der unterschiedlichen Kinetik der Ig-Klassen, insbesondere IgM und IgY, und deren Detektierbarkeit durch die beiden Testmethoden gesehen werden. Es ist bekannt, dass sich mit der Zeit nach Infektion nicht nur die Zusammensetzung der im Serum vorhandenen Ig-Klassen, sondern auch die Bindungskraft der einzelnen Antikörperfraktionen für die viralen Antigene (funktionelle Affinität) ändert (Gosling, 1996). Sowohl das in den ersten Wochen nach Viruskontakt dominierende IgM als auch frühes IgY haben im Allgemeinen eine geringere Antigenaffinität als das IgY der späteren Immunantwort. Dies ist auf die, im Laufe der Infektion und der wirtseigenen Abwehrvorgänge fortschreitende Reifung der Affinität des IgY sowie die Antigen-getriebene B-Zell-Selektion zurückzuführen (Fox *et al.*, 2006). Weiterhin ist bewiesen, dass IgM aufgrund seiner polymeren Struktur multidimensionale Antigene, wie virale Partikel, wesentlich effizienter bindet als IgY (Keller, 1994; Kuby, 1997). So ist anzunehmen, dass die zu Beginn der Serokonversion in hohen Konzentrationen gebildeten, wenig affinen Antikörper der IgM-Klasse im HAH eine deutliche Reaktivität hervorrufen, die im weiteren Verlauf der Antikörper-Antwort mit Abnahme des IgM-, bei gleichzeitiger Zunahme des IgY-Anteils wieder abfällt. Auf der anderen Seite kann der im ELISA gemessene längere Anstieg und spätere Peak der Antikörper-Antwort nach Immunisierung darauf zurückgeführt werden, dass die im Laufe der Immunreaktion in ihrer funktionellen Affinität reifenden Antikörper der IgY-Klasse den Kräften beim Waschen der ELISA-Platten immer besser widerstehen und somit mit dem ELISA effektiver erfasst werden können.

Der etablierte ELISA zeigte in der vorliegenden Studie eine gute Eignung zur Kontrolle des Antikörperstatus bei Gänsen und Enten nach Vakzination mit einem ND-Inaktivatimpfstoff für Hühner. Von großer Bedeutung im Rahmen der Evaluierung eines serologischen Tests ist die Ermittlung seiner diagnostischen Sensitivität und Spezifität (DSe und DSp). Eine hohe DSe ist nötig, wenn möglichst alle positiven Tiere identifiziert werden sollen, z.B. zur Bekämpfung gefährlicher Infektionen oder im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen. Ferner für Tests, die zum „Screening“ größerer Probenzahlen spezifischeren Testverfahren vorgeschaltet werden sollen. Eine hohe DSp der zum Einsatz kommenden Testsysteme ist

dagegen im Rahmen des Antikörper-Nachweises nach Impfung von Vorteil, um Impfversager zu erkennen und gegebenenfalls eine Auffrischungs-Vakzination einleiten zu können. Beide Parameter wurden für den in der vorliegenden Studie etablierten ELISA, anhand der zur Verfügung stehenden Seren geimpfter Enten und Gänse, basierend auf dem Vakzinationsstatus der Tiere bei Probenentnahme ermittelt. Der ELISA erwies sich als sehr sensitives (DSe 92.2%) und spezifisches (DSp 96.2%) Testverfahren. Seine DSe lag um 9.2% höher als die des HAH (83.0%). Insbesondere zu späteren Zeitpunkten nach Vakzination (7. und 10. Wochen p.v.) erscheint der etablierte ELISA deshalb besser geeignet als der HAH, eine Ja-Nein-Antwort bezüglich der Induktion von Antikörpern und somit der Immunogenität des Impfstoffes zu geben. Um sicher zu sein, dass die Impfung Antikörper induziert hat, müssten somit im ELISA wesentlich weniger Tiere positiv getestet werden als im HAH (s. Veröffentlichung 2). Was die DSp betrifft, war der HAH (100.0%) dem ELISA dagegen um 3.8% überlegen. Die ELISA-Werte falsch positiver Proben lagen jedoch nahe am Cutoff. Durch eine Anhebung des Grenzwertes könnte somit die DSp des ELISA erhöht werden. Zudem wäre in weiterführenden Untersuchungen zu eruieren, ob durch die Verwendung von aufgereinigten viralen Proteinen als „Coating“-Antigen anstelle der Vollvirusaufreinigung eine Steigerung der Spezifität erzielt werden kann. In Vollvirusaufreinigungen enthaltene, unspezifisch reagierende Bestandteile würden so wegfallen. Derartige ELISA-Systeme wurden in der serologischen ND-Diagnostik bereits für Hühner entwickelt (Errington *et al.*, 1995; Makkay *et al.*, 1999; Mohan *et al.*, 2006). Bedacht werden müssen allerdings die unvermeidbaren negativen Auswirkungen beider oben genannten Maßnahmen auf die DSe des ELISA. Zum Beispiel können mit ELISA-Systemen, die ein einziges Protein als Antigen verwenden nicht alle virusspezifischen, sondern nur die spezifisch gegen das verwendete Protein gerichteten Antikörper erfasst werden.

Die Klärung der Frage, ob der für das Wassergeflügel etablierte indirekte ND-ELISA in anderen Bereichen der serologischen Diagnostik, z.B. im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen, eine ähnliche DSe und DSp aufweist, wie im Rahmen der Impfkontrolle, würde die Testung von Feldseren erfordern.

Wichtige Parameter für die Beurteilung der Eignung eines Tests zur Kontrolle des Vakzinationserfolges sind ferner sein positiver und sein negativer Vorhersagewert. Sie geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein positives bzw. negatives Testergebnis mit der

Wirklichkeit übereinstimmt. Beide müssen aber streng in Bezug auf die im jeweiligen Fall herrschende Prävalenz, d.h. die Anzahl immunisierter Tiere, gesehen werden, denn bei einer Prävalenz von 0% ist auch der positive Vorhersagewert 0%. Um beide Parameter für den etablierten ELISA zu bestimmen wäre es sinnvoll, mehrere Populationen mit definierten Prävalenzen geimpfter Tiere zu untersuchen.

4.3 Effizienz des inaktivierten Newcastle Disease-Impfstoffes für Hühner beim Wassergeflügel

Der inaktivierte ND-Impfstoff für Hühner erwies sich, nach dem Grad der Antikörperantwort zu urteilen, als sehr immunogen für das Wassergeflügel. Bereits 3 Wochen nach Impfung war sowohl bei den Hausgänsen als auch bei den Moschusenten eine deutliche Serokonversion zu verzeichnen, die mittels HAH und ELISA bis zum Versuchsende (10 Wochen p.v.) nachweisbar war. Aufgrund eines erneuten signifikanten Antikörperanstiegs 10 Wochen nach der Impfung ist der doppelten Hühnerdosis eine höhere Effizienz zuzuschreiben, was die Induktion der Immunantwort betrifft. In Übereinstimmung mit dem vorliegenden Ergebnis stellten Dai und Mitautoren (2008) in den Vorversuchen zu ihrer Wirksamkeitsstudie von ND-Impfstoffen beim Wassergeflügel fest, dass die vom Hersteller für Hühner empfohlenen Dosen bei Gänseküken durchweg mindestens verdoppelt werden müssen, um eine sichtbare Antikörperantwort hervorzurufen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effizienz eines für das Wassergeflügel etablierten indirekten ELISA zum Nachweis der Antikörper-Antwort nach ND-Impfung zu untersuchen. Die Klärung der Frage, ob die Immunreaktion auch mit einem Schutzeffekt korreliert ist und wie hoch dieser ist, d.h. die Beurteilung der Eignung des indirekten ELISA zur Bestimmung der Schutzwirkung von Impfstoffen bzw. Impfprogrammen, würde darüber hinaus Belastungsversuche mit den geimpften Tieren erfordern. Eine Schutzwirkung wird insbesondere den gegen das F- und das HN-Protein gerichteten Antikörpern zugesprochen. In Untersuchungen von Reynolds und Maraqa (2000) waren passiv mit, gegen das HN- und F-Protein gerichtetem Antiserum immunisierte Hühner unempfindlich gegenüber einer Belastungsinfektion mit velogenem NDV, während auf die gleiche Weise mit, gegen das N-

und P- bzw. M-Protein gerichtetem Antiserum vakzinierte Tiere erkrankten. Die allgemeine Auffassung ist deshalb, dass unter den serologischen Testverfahren Virusneutralisationstest und HAH die sichersten Aussagen über den Schutzstatus gegen ND liefern, da sie genau diese Antikörper nachweisen. Statistische Analysen von Goddard und Mitautoren (1988) deuten darauf hin, dass geeignete Impfstoffe in Gruppen von 25 Vögeln einen mittleren HAH-Grenztiter von $\log_2 4$ bewirken sollten, um sicherzugehen, dass die Impfung ausreichenden Schutz gewährleistet. Auf das Wassergeflügel übertragen, wären die Gänse und Enten in der vorliegenden Studie sowohl in der einfachen als auch in der zweifachen Dosisgruppe zu allen drei Untersuchungszeitpunkten nach Impfung (3, 7 und 10 Wochen p.v.) geschützt gewesen, da der mittlere HAH-Titer kontinuierlich $\geq \log_2 4$ war (s. Veröffentlichung 2). In der einfachen Dosisgruppe zeigten 89,5%, 73,7% bzw. 66,7% der Tiere 3, 7 bzw. 10 Wochen p.v. einen schützenden Antikörpertiter, in der zweifachen Dosisgruppe 93,8%, 78,6% bzw. 100,0%. Von einem mittleren HAH-Grenztiter von $\log_2 4$ gingen auch Dai und Mitautoren (2008) bei der serologischen Beurteilung der Schutzwirkung verschiedener Vakzinen bzw. Impfprogramme bei Gänsen aus. Die Dauer des, durch eine inaktive ND-Vakzine induzierten Schutzeffekts bei Gänsen wurde so auf 6 Wochen geschätzt. 21 Tage nach Impfung waren alle Gänse gegenüber der Belastung mit einem gänsepathogenen NDV-Stamm geschützt. Die besten Ergebnisse, was Antikörperantwort und Schutzwirkung betrifft, lieferte die Applikation eines auf dem lentogenen Stamm La Sota basierenden Lebendimpfstoffs in Kombination mit einer zwei Wochen später erfolgenden Auffrischung durch eine aktive Vakzine auf der Basis des mesogenen Stammes Muktsewar. Die so immunisierten Tiere waren auch 140 Tage nach der Auffrischungs-Impfung noch gegenüber der Belastungsinfektion geschützt.

Trotz der obigen Tatsachen liegen auch Untersuchungen über die Eignung indirekter Vollvirus-ELISAs zur Bestimmung des Schutzgrades gegen ND vor. So berichten Wilson und Mitautoren (1984), Goddard und Mitautoren (1988) sowie Kapczynski und King (2005) bei Hühnern von einer direkten positiven Korrelation zwischen ELISA-Ergebnissen und Überlebensraten bzw. Schutz vor Krankheit nach Infektion mit virulentem NDV. In der Studie von Goddard und Mitautoren (1988) war über den ELISA eine korrekte Beurteilung der Wirksamkeit einer Auswahl von insgesamt 27 inaktivierten Impfstoffen möglich. Alle im Belastungs-Experiment eine Schutzwirkung vermittelnden Impfstoffe wurden serologisch richtig beurteilt, wenn als Beurteilungskriterium für den Schutzstatus ein Verhältnis der

mittleren ELISA-Werte geimpfter zu denen ungeimpfter Tiere von 4 zu 1 gewählt wurde. Adair und Mitautoren (1989) folgerten aus ihren Untersuchungen sogar, dass sich der ELISA, aufgrund der exakteren Korrelation seiner Ergebnisse mit dem Schutz gegenüber der Belastungsinfektion, besser als Indikator des Immunstatus von Hühnern und Puten nach Impfung eignet als der HAH. Nach Balla und Mitautoren (1976) ermöglicht der HAH nur 2 bis 3 Wochen nach Immunisierung verlässliche Aussagen über den Immunstatus der Population und damit über die Effizienz eines Impfprogramms. Die in den eigenen Untersuchungen festgestellte höhere rDSe des ELISA, 7 und 10 Wochen p.v., spricht für diese Vermutung. Die Abklärung der Frage, ob und mit welchem Test beim Wassergeflügel eine serologische Abschätzung des Schutzstatus möglich ist, wird jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten.

In Bezug auf den diagnostischen Einsatz serologischer Untersuchungen zur Impfkontrolle sollte aber immer bedacht werden, dass der Immunitätsgrad, der vor Erkrankung schützt, nicht notwendigerweise auch eine Virusreplikation unterbindet. Somit sind geimpfte Vögel in gewissem Ausmaß immer noch eine wichtige Infektionsquelle (Alexander, 1988b). Nach Untersuchungen von van Boven und Mitautoren (2008) muss ein hoher Prozentsatz vakzinierter Hühner (> 85.0%) einen hohen Antikörpertiter ($\log_2 \geq 3$) aufweisen, um sicherzustellen, dass neben dem Schutz vor Erkrankung auch die Virusreplikation und damit die Virusausscheidung soweit unterdrückt werden, dass es nicht zur Weiterverbreitung von Feldvirusinfektionen in der geimpften Population kommt. Diese Tatsache ist insbesondere übertragen auf die Impfung beim Wassergeflügel von Bedeutung, da hier zumindest in Europa weniger die Verhinderung von Erkrankungsfällen im Vordergrund steht, sondern vielmehr die Unterbindung der Übertragung velogener und potentiell pathogener APMV-1 vom Wassergeflügel auf empfänglichere Wirtschaftsgeflügelpezies.

Die serologische Kontrolle von Impfmaßnahmen macht nachvollziehbar, ob eine Impfung sachgerecht durchgeführt wurde, d.h. ein Großteil der vakzinierten Population eine messbare Immunantwort entwickelt hat. Der im Rahmen der vorliegenden Studie etablierte ELISA erwies sich hierfür als sehr geeignet. Eine Aussage über den Grad des mit der Impfung erreichten Schutzes vor Virusreplikation und –ausscheidung sowie vor einer Erkrankung nach Infektion mit für Wassergeflügel pathogenen APMV-1 ist dagegen nach dem derzeitigen

Wissensstand mit dem ELISA nicht möglich und würde weitergehende Untersuchungen erfordern.

4.4 Newcastle Disease beim Wassergeflügel – Impfstrategien und ihre Überwachung

Die Ergebnisse virologischer und serologischer Untersuchungen von wildem und domestiziertem Wassergeflügel deuten darauf hin, dass diesen Vogelarten eine potentielle Rolle in der Epidemiologie der Newcastle Disease zukommt. Insbesondere die in experimentellen Studien für Enten und Gänse belegte, im Vergleich zu Hühnervögeln in der Regel wesentlich höhere Resistenz gegenüber klinischer Erkrankung, bei gleichzeitiger Infektionsempfänglichkeit mit Virusreplikation und -ausscheidung, untermauert diese Vermutung. Wassergeflügel kann sich auf direktem oder indirektem Weg bei erkrankten Hühnervögeln infizieren und könnte als unerkannter Träger die Ausbreitung der Infektion forcieren (s. Abschnitt 2.3.3 und 2.3.8). Wildes Wassergeflügel kommt aufgrund seiner unkontrollierbaren, z.T. hohen Motilität als potentieller Vektor über weite Entfernungen in Frage (Sakai *et al.*, 2007).

Domestiziertes Wassergeflügel sollte aus obigen Gründen, insbesondere vor Ausstellungen oder sonstigen Kontakten zu empfänglichen Wirtschaftsgeflügelspezies sowie anlässlich von Ausbruchsgeschehen, in Impfprogramme einbezogen werden. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welches Impfschema und welcher Impfstoff beim Wassergeflügel für den jeweiligen Zweck am besten geeignet sind. Vor Ausstellungen sollte aus Sicherheitsgründen nur mit inaktiven Impfstoffen immunisiert werden. Diese Totvakzinen sind weniger anfällig gegenüber Umwelteinflüssen, wie Hitze und Chemikalien, und daher für Kleinstbestände sicher in der Anwendung. Zudem besteht bei Totvakzinen nicht die Gefahr einer Ausscheidung des Impfvirus. Die Impfung sollte mindestens drei Wochen vor dem Ausstellungsbesuch erfolgen, da erst nach dieser Zeit von einer ausreichenden Immunität auszugehen ist. Im Seuchenfall wären dagegen Impfstoffe zu bevorzugen, die in möglichst kurzer Zeit einen ausreichenden Schutz gewährleisten sowie eine schnelle, einfach durchzuführende Massenapplikation zulassen. In dieser Hinsicht besitzen Lebendimpfstoffe deutliche Vorteile gegenüber Totvakzinen. Es ist jedoch aufgrund von Vakzinationsstudien

davon auszugehen, dass die in Deutschland zugelassenen lentogenen APMV-1-Impfstämme beim Wassergeflügel wenig Wirksamkeit zeigen (Bolte *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2008). Da der Einsatz von Impfstämmen höherer Pathogenität, wie er von Dai und Mitautoren (2008) vorgeschlagen wird, in Deutschland und der EWG rechtlich (GP-VO §5 (2); Entscheidung 93/152/EWG) nicht zulässig ist, stellen zur Zeit beim Wassergeflügel auch in diesem Fall inaktivierte APMV-1-Vakzinen die beste Wahl dar. Die Immunogenität derartiger Impfstoffe konnte in der vorliegenden Studie sowie von Dai und Mitautoren (2008) gezeigt werden. Die Ergebnisse weisen zudem darauf hin, dass mit der doppelten Hühnerdosis beim Wassergeflügel eine bessere und länger anhaltende Immunantwort erzielt werden kann. Gegebenenfalls könnte die kombinierte, zeitgleiche Verabreichung einer Tot- und einer Lebendvakzine in Erwägung gezogen werden. Aktive haben gegenüber inaktiven Impfstoffen den Vorteil, dass sie aufgrund des direkten, oralen bzw. nasal Applikationsweges auch die lokale Immunabwehr, d.h. die Schleimhautimmunität im Respirations- und Intestinaltrakt stimulieren und somit die Virusreplikation an der Eintrittspforte reduzieren bzw. unterbinden können. So beobachteten Kapczynski und King (2005) bei ihren Untersuchungen an Hühnern, dass nach Applikation eines ND-Lebendimpfstoffs und anschließender Belastungsinfektion sowohl die Anzahl der Ausscheider als auch die ausgeschiedene Viruslast im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe reduziert waren. Mit einer Totvakzine geimpfte Tiere schieden zwar ebenfalls weniger Virus aus, die Anzahl der Ausscheider unterschied sich jedoch nicht wesentlich von der der Kontrollgruppe. Das Risiko einer lokalen Virusreplikation unter dem Deckmantel hoher Serumantikörperspiegel könnte also durch die gleichzeitige Verabreichung eines Lebendimpfstoffs verringert werden. Die Effizienz einer derartigen Kombination müsste allerdings noch experimentell abgeklärt werden.

Da für das Wassergeflügel in Deutschland bisher keine ND-Impfstoffe zugelassen sind und eine Umwidmung gesetzlich nicht erlaubt ist (TierSG §17c (4) 4.a), muss für die Durchführung einer APMV-1-Impfung beim Wassergeflügel eine Ausnahmegenehmigung bei der obersten Landesbehörde beantragt werden.

Für die Überprüfung, ob die Impfung eine Antikörper-Antwort induziert hat, sind wie bei Hühnervögeln serologische Untersuchungen zu empfehlen. Der in der vorliegenden Studie etablierte indirekte ELISA hat sich hierfür als sehr geeignet erwiesen. Es ist naheliegend, dass

er sich auch für das Vorscreening großer Probenmengen im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen bewährt. Die Abklärung dieses Sachverhalts erfordert eingehendere Analysen der Kreuzreaktivität des mAk 14A3 mit Seren eines breiteren Spektrums wilder Wassergeflügelarten sowie die Untersuchung einer repräsentativen Anzahl von Feldseren. Des Weiteren ist zu erwarten, dass das Testprinzip des etablierten ELISA relativ einfach auch auf andere Virussysteme, wie beispielsweise aviäre Influenzaviren übertragen werden kann. Diese Tatsache ist insbesondere in Bezug auf die aktuelle Seuchensituation von Bedeutung. Für die Spezifizierung (Serotypisierung) von im Vorscreening positiv reagierenden Seren aus epidemiologischen Untersuchungen ist jedoch, insbesondere was APMV und aviäre Influenzaviren betrifft, weiterhin der HAH unerlässlich. Der WB bleibt weitestgehend wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten, ist aber, wie die eigenen Untersuchungen zeigen, zur Abklärung von im ELISA und HAH fraglich reagierenden Seren als Bestätigungstest zu empfehlen, da er in gewissem Rahmen eine Unterscheidung zwischen spezifischer, gegen virale Proteine gerichteter und unspezifischer Reaktivität ermöglicht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Enzymverstärkte Testsysteme wie der ELISA finden in der serologischen Diagnostik bei Hühnervögeln bereits breite Anwendung. Beim Wassergeflügel gilt dagegen immer noch der Hämagglutinationshemmungstest (HAH) als Test der ersten Wahl. Für große Probenmengen ist er jedoch ungeeignet und insbesondere bei Seren mangelhafter Qualität mit dem Problem unspezifischer Reaktionen behaftet. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Etablierung alternativer serologischer Testverfahren auch für das Wassergeflügel.

Basierend auf einem monoklonalen, gegen die leichte Kette von Pekingtonen-Immunglobulin (Ig) gerichteten Antikörper (mAk 14A3) (Kothlow *et al.*, 2005) wurden im Rahmen dieser Arbeit indirekte Testsysteme für das Wassergeflügel etabliert. Die Kreuzreaktivität des mAk 14A3 mit verschiedenen Entenspezies (Flugente = *Cairina moschata*, Stockente = *Anas platyrhynchos*, Weißflügelente = *Asarcornis scutulatus*, Spießente = *Dafila acuta*) sowie zwei Schwanenspezies (Höckerschwan = *Cygnus olor*, Schwarzhalschwan = *Sthenelides melanocoryphus*) und zwei Gänsespezies (Hausgans = *Anser anser var. domestica*, Rothalsgans = *Rufibrenta ruficollis*) wurde mittels Western Blot (WB) überprüft. Der Antikörper wies Reaktivität gegenüber der leichten Kette des Serum-Ig aller getesteten Wassergeflügelartenspezies auf. Mit Hilfe seropositiver Seren von gegen aviäre Paramyxoviren des Serotyps 1 (APMV-1) geimpften Hausgänsen und Moschusenten konnte gezeigt werden, dass der Antispezies-Antikörper fähig ist die spezifische Färbung APMV-1-infizierter Zellen im Immunfluoreszenztest zu vermitteln. Darüber hinaus bewährte er sich auch im indirekten ELISA und im WB (Kothlow *et al.*, 2008).

Mit dem etablierten indirekten Newcastle Disease (ND)-ELISA ließ sich in Seren adulter Moschusenten und Hausgänse drei Wochen nach Vakzination mit einem inaktivierten ND-Impfstoff für Hühner eine Serokonversion nachweisen, die bis zum Versuchsende (10 Wochen p.v.) anhielt. Zwischen den ELISA-Werten und den parallel ermittelten HAH-Titern war eine positive lineare Korrelation feststellbar (Pearson's product moment correlation; $r = 0.652$; $P < 0.001$). In Woche 7 und 10 nach der Impfung erkannte der ELISA jedoch zehn Seren geimpfter Tiere mehr positiv als der HAH, wobei für acht dieser Seren mittels WB eine spezifisch gegen aviäre Paramyxoviren gerichtete Reaktivität bestätigt werden konnte. Die sich aus dem Vergleich der Tests ergebende relative diagnostische Sensitivität (rDSe) des ELISA (100.0%) war höher als die des HAH (91.1%), seine relative diagnostische Spezifität

(rD_{Sp}) etwas niedriger (ELISA: 91.7%; HAH: 97.2%). Die zweimalige Testung aller Seren unter den gleichen Versuchsbedingungen ergab eine sehr gute Wiederholbarkeit des etablierten ELISA mit einer positiven linearen Korrelation der Ergebnisse (Pearson's product-moment correlation; $r = 0.982$; $P < 0.001$; $ls = 0.05$) (Häuslaigner *et al.*, 2009).

Der untersuchte monoklonale Antispezies-Antikörper stellt somit ein attraktives und vielseitig einsetzbares Reagenz dar, das die Möglichkeit eröffnet, serologische Testverfahren für das Wassergeflügel, zum Einsatz in Diagnostik und Forschung zu entwickeln. Der etablierte indirekte ELISA erwies sich als gut geeignet, die Immunantwort beim Wassergeflügel nach ND-Impfung zu detektieren. Die gute Reproduzierbarkeit seiner Ergebnisse spricht für eine hohe Aussagesicherheit. Basierend auf der sich aus dem Vakzinationsstatus ergebenden diagnostischen Sensitivität (D_{Se}) (92.2%) und Spezifität (D_{Sp}) (96.2%), kann der etablierte ND-ELISA als geeignete Alternativ- und Ergänzungsmethode zum HAH (D_{Se} 83.0%, D_{Sp} 100.0%) angesehen werden. Vor allem zu späteren Zeitpunkten nach Viruskontakt scheint er mehr seropositive Reagenten als der HAH zu erkennen, wohingegen sich letzterer in der D_{Sp} überlegen zeigte.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen unterstreichen zudem die Immunogenität des inaktivierten ND-Impfstoffes bei domestizierten Hausgänsen und Moschusenten, wobei die doppelte Hühnerdosis eine effizientere Antikörper-Antwort zu induzieren scheint.

6 SUMMARY

Application of a monoclonal antibody directed against the immunoglobulin light chain of Pekin ducks in a Newcastle Disease-ELISA to control the humoral immune response in waterfowl after vaccination

Common immunoassays as the ELISA are already widely used for serological diagnosis in gallinaceous birds, whereas for waterfowl the haemagglutination inhibition test (HI test) is still the method of choice. However, this test is not compatible with large sample numbers and afflicted with high nonspecific reactivity, especially concerning sera of lower quality. Therefore, an alternative serological test system for waterfowl would be of great benefit.

In this study accordant indirect immunoassays were established based on a monoclonal antibody, reactive with the immunoglobulin (Ig) light chain of Pekin ducks (mAb 14A3) (Kothlow *et al.*, 2005). The cross-reactivity of mAb 14A3 with different duck species (Muscovy duck = *Cairina moschata*, Mallard = *Anas platyrhynchos*, white-winged wood duck = *Asarcornis scutulatus*, common pintail = *Dafila acuta*) as well as two swan species (mute swan = *Cygnus olor*, black-necked swan = *Sthenelides melanocoryphus*) and two goose species (domestic goose = *Anser anser var. domestica*, redbreasted goose = *Rufibrenta ruficollis*) was verified by Western Blot (WB) analysis. The antibody showed reactivity with the serum-Ig light chain of all waterfowl species tested. Using seropositive sera of domestic geese and Muscovy ducks vaccinated against avian paramyxovirus serotype 1 (APMV-1), the antispecies-antibody facilitated specific staining of APMV-1-infected cells in the immunofluorescence (IF) test. In addition, it proved to be functional in an indirect ELISA and a WB assay (Kothlow *et al.*, 2008).

With the established indirect Newcastle Disease (ND)-ELISA seroconversion was evident in sera of adult Muscovy ducks and domestic geese already three weeks after vaccination with an inactivated ND-vaccine. Avian paramyxovirus (APMV)-specific reactivity was still evident at the end of the study, ten weeks after immunisation. Comparison of the ELISA results with those of the HI test provided a positive linear correlation between both tests (Pearson's product moment correlation; $r = 0.652$; $P < 0.001$). In week 7 and 10 following vaccination, however, a discrepancy of test results was evident, with ten sera of vaccinated birds evaluated negative by HI test but positive by ELISA. Eight of these sera were confirmed to

yield APMV-specific reactivity by WB analysis. The relative diagnostic sensitivity (rDSe) (100.0%) of the ELISA, resulting from the comparison of these tests, was higher than that of the HI test (91.1%), its relative diagnostic specificity (rDSp) slightly lower (ELISA: 91.7%; HI test: 97.2%). Testing the same sera twice under the same working conditions revealed a very good repeatability of the established ELISA, with a positive linear correlation of the test results (Pearson's product-moment correlation; $r = 0.982$; $P < 0.001$; $ls = 0.05$) (Häuslaigner *et al.*, 2009).

Thus, the analysed monoclonal antispecies-antibody represents an attractive and versatile reagent that offers the opportunity to develop appropriate serological tests for diagnostics and research in waterfowl. The established indirect ELISA proved very suitable to detect immune response in waterfowl after ND-vaccination. The good repeatability of test results points to a high level of confidence. Based on its diagnostic sensitivity (DSe) (92.2%) and specificity (DSp) (96.2%), resulting from the vaccination status, the established ND-ELISA represents a suitable alternative and supplementation to the HI test. Especially at later time points after virus contact, the ELISA seems to identify more seropositive reagents than the HI test, whereas the latter proved superior concerning the DSp.

Further on, the results of this study emphasize the immunogenicity of the inactivated ND-vaccine in domestic geese and Muscovy ducks, with an apparently stronger and longer lasting humoral immune response in birds receiving a two-fold chicken dosage.

7 LITERATURVERZEICHNIS

7.1 Gesetzestexte

92/66/EWG Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaft vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle-Krankheit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 1992; Nr. L260 S. 1-20.

93/152/EWG Entscheidung der Kommission vom 8. Feb. 1993 über die Kriterien für Impfstoffe für Routineimpfungen gegen die Newcastle-Krankheit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 1993; Nr. L59 S. 35.

Änderung der Geflügelpest-Verordnung vom 24. November 1995 (BGBl. I 1995 S. 1550).

Neufassung der Geflügelpest-Verordnung vom 21. Dezember 1994 (BGBl. I 1994 S. 3930).

Tierseuchengesetz (TierSG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004 (BGBl. I S. 1260; 3588), zuletzt geändert durch Artikel 1§ 5 Abs. 3 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2930).

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2004 (BGBl. I S. 2764), zuletzt geändert durch Artikel 2 der Verordnung vom 24. November 2008 (BGBl. I S. 2315).

Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit vom 19. Dezember 1972 (BGBl. I 1972 S. 2509), neugefasst durch die Bekanntmachung vom 20. Dezember 2005 (BGBl. I 2005 S. 3538).

7.2 Literatur

Abenes, G.B., Okazai, K., Fukushi, H., Kida, H., Honda, E., Yagyu, K., Tsuji, M., Sato, H., Ono, E., Yanagawa, R. & Yamaguchi, N. (1982). Isolation of ortho- and paramyxoviruses from feral birds in Hokkaido, Japan - 1980 and 1981. *Japanese Journal of Veterinary Science*, *44*, 703-708.

Adair, B.M., McNulty, M.S., Todd, D., Connor, T.J. & Burns, K. (1989). Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA. *Avian Pathology*, *18*, 175-192.

Albiston, H.E. & Gorrie, C.J.R. (1942). Newcastle disease in Victoria. *The Australian Veterinary Journal*, *18*, 75-79.

Aldous, E.W. & Alexander, D.J. (2001). Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology*, *30*, 117-128.

Aldous, E.W., Collins, M.S., McGoldrick, A. & Alexander, D.J. (2001). Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. *Veterinary Microbiology*, *80*, 201-212.

Alexander, D.J. (1982). Avian paramyxoviruses – other than Newcastle disease virus. *World's Poultry Science Journal*, *38*, 97-104.

Alexander, D.J. (1988a). Newcastle disease: methods of spread. In D.J. Alexander (Ed.), *Newcastle Disease* (pp. 256-272). Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.

Alexander, D.J. (1988b). Newcastle disease diagnosis. In D.J. Alexander (Ed.), *Newcastle Disease* (pp. 147-160). Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.

Alexander, D.J. (1995). The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *Journal of Comparative Pathology*, *112*, 105-126.

Alexander, D.J. (2001). Newcastle Disease. *British Poultry Science*, 42, 5-22.

Alexander, D.J., Russell, P.H., Parsons, G., Abu Elzein, E.M.E., Ballouh, A., Cernik, K., Engstrom, B., Fevereiro, M., Fleury, H.J.A., Guittet, M., Kaleta, E.F., Kihm, U., Kusters, J., Lomniczi, B., Meister, J., Meulemans, G., Nerome, K., Petek, M., Pokomunski, S., Polten, B., Prip, M., Richter, R., Saghi, E., Samberg, Y., Spanoghe, L. & Tumova, B. (1985). Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons - an international collaborative study. *Avian Pathology*, 14, 365-376.

Alexander, D.J., Campbell, G., Manvell, R.J., Collins, M.S., Parsons, G. & McNulty, M.S. (1992). Characterisation of an antigenically unusual virus responsible for two outbreaks of Newcastle disease in the Republic of Ireland in 1990. *The Veterinary Record*, 130, 65-68.

Alexander, D.J., Manvell, R.J., Lowings, J.P., Frost, K.M., Collins, M.S., Russell, P.H. & Smith, J.E. (1997). Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 26, 399-418.

Alexander, D.J. & Senne, D.A. (2008). Newcastle Disease. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry* 12th edn (pp. 75-100). Iowa, Oxford, Victoria: Blackwell Publishing.

Alfonso, C.P., Cowen, B.S. & van Campen, H. (1995). Influenza A viruses isolated from waterfowl in two wildlife management areas of Pennsylvania. *Journal of Wildlife Diseases*, 31, 179-185.

Al Imadi, M.A. & Tanyi, J. (1982). The susceptibility of domestic waterfowls to Newcastle disease virus (NDV) and their role in its spread. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 30, 31-43.

Allan, W.H. & Gough, R.E. (1974). A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease. (1) A comparison of macro and micro methods. *The Veterinary Record*, 95, 120-123.

Arenas, A., Carranza, J., Perea, A., Miranda, A., Maldonado, A. & Hermoso, M. (1990). Type A influenza viruses in birds in southern Spain: serological survey by enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test. *Avian Pathology*, *19*, 539-546.

Asplin, F.D. (1947). Newcastle disease in ducks and geese. *The Veterinary Record*, *59*, 621-624.

Astorga, R.J., Cubero, M.J., Leon, L., Maldonado, A., Arenas, A., Tarradas, M.C. & Perea, A. (1994a). Serological survey of infections in waterfowl in the Guadalquivir marshes (Spain). *Avian Diseases*, *38*, 371-375.

Astorga, R.J., Leon, L., Cubero, M.J., Arenas, A., Maldonado, A., Tarradas, M.C. & Perea, A. (1994b). Avian influenza in wild waterfowl and shorebirds in the Doñana National Park: serological survey using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathology*, *23*, 339-344.

Avrameas, S. (1969a). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry*, *6*, 43-52.

Avrameas, S. (1969b). Indirect immunoenzyme techniques for the intracellular detection of antigens. *Immunochemistry*, *6*, 825-831.

Avrameas, S. (1983). Enzyme immunoassays and related techniques: development and limitations. In P.A. Bachmann (Ed.), *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 93-99). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Avrameas, S. & Guilbert, B. (1971). A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *European Journal of Immunology*, *1*, 394-396.

Bahl, A.K., Pomeroy, B.S., Mangundimedjo, S. & Easterday, B.C. (1977). Isolation of type A Influenza and Newcastle disease viruses from migratory waterfowl in the Mississippi flyway.

Journal of the American Veterinary Medical Association, 171, 949-951.

Balla, L., Papócsi, L., Szurop, I. & Tóth, B. (1976). Studies on the correlation between the results of the haemagglutination-inhibition test and the immunity against Newcastle disease. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 26, 235-242.

Ballagi-Pordány, A., Wehmann, E., Herczeg, J., Belák, S. & Lomniczi, B. (1996). Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Archives of Virology*, 141, 243-261.

Bolte, A.L. (1998). Untersuchungen zum Vorkommen der Newcastle-Krankheit bei Graugänsen (*Anser anser* Linné, 1758) und Hausgänsen sowie zur Immunprophylaxe der Newcastle-Krankheit der Hausgänse. Vet.-med. Diss., Univ. Gießen.

Bolte, A.L., Lutz, W. & Kaleta, E.F. (1997). Untersuchungen zum Vorkommen von Ortho- und Paramyxovirus-bedingten Infektionen bei freilebenden Graugänsen (*Anser anser* Linné, 1758). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 43, 48-55.

Bolte, A.L., Voss, M., Vielitz, E. & Kaleta, E.F. (2001). Response of domestic geese to lentogenic and velogenic strains of Newcastle disease virus. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108, 155-159.

Boyd, R.J. & Hanson, R.P. (1958). Survival of Newcastle disease virus in nature. *Avian Diseases*, 2, 82-93.

Bozorgmehri-Fard, M.H. & Keyvanfar, H. (1979). Isolation of Newcastle disease virus from teals (*Anas crecca*) in Iran. *Journal of Wildlife Diseases*, 15, 335-337.

Bradshaw, J.E. & Trainer, D.O. (1966). Some infectious diseases of waterfowl in the Mississippi flyway. *Journal of Wildlife Management*, 30, 570-576.

Brown, J., Resurreccion, R.S. & Dickson, T.G. (1990). The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. *Avian Diseases*, 34, 585-587.

Büttner, M. (2002). Allgemeine Virologie. In M. Rolle & A. Mayr, *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7. Auflage (S. 65-143). Stuttgart: Enke Verlag.

Burnet, F.M. (1942). The affinity of Newcastle disease virus to the influenza virus group. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 20, 81-88.

Bush, D.L. (1954). Observations on a Newcastle disease enzootic in Haiti. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 125, 474-475.

Butler, J.E., Feldbush, T.L., McGivern, P.L. & Stewart, N. (1978). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a measure of antibody concentration or affinity? *Immunochemistry*, 15, 131-136.

Cadman, H.F., Kelly, P.J., de Angelis, N.D., Rohde, C., Collins, N. & Zulu, T. (1997). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathology*, 26, 357-363.

Charan, S., Rai, A. & Mahajan, V.M. (1981). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of Newcastle disease virus antibodies in human sera. *Journal of Clinical Pathology*, 34, 90-92.

Collins, M.S., Bashiruddin, J.B. & Alexander, D.J. (1993). Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Archives of Virology*, 128, 363-370.

Collins, M.S., Franklin, S., Strong, I., Meulemans, G. & Alexander, D.J. (1998). Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein

monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. *Avian Pathology*, 27, 90-96.

Connaris, H., Takimoto, T., Russell, R., Crennell, S., Moustafa, I., Portner, A. & Taylor, G. (2002). Probing the sialic acid binding site of the haemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion. *Journal of Virology*, 76, 1816-1824.

Cook, D.B. & Self, C.H. (1995). Monoclonal antibodies in diagnostic immunoassays. In M.A. Ritter & H.M. Ladyman (Eds.), *Monoclonal antibodies – production, engineering and clinical application* (pp. 180-208). Cambridge, New York, Melbourne: Cambridge University Press.

Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. & Berliner, E. (1942). The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *The Journal of Immunology*, 45, 159-170.

Crennell, S., Takimoto, T., Portner, A. & Taylor, G. (2000). Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus haemagglutinin-neuraminidase. *Nature Structural Biology*, 7, 1068-1074.

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

Dai, Y., Liu, M. & Li, W. (2008). Protective efficacy of commercial Newcastle disease vaccines against challenge of goose origin virulent Newcastle disease virus in geese. *Avian Diseases*, 52, 467-471.

Davison, F., Kaspers, B. & Schat, K.A. (2008). *Avian Immunology* 1st edn (chapter 6). Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press Elsevier-Verlag.

Deibel, R., Emord, D.E., Dukelow, W., Hinshaw, V.S. & Wood, J.M. (1985). Influenza viruses and paramyxoviruses in ducks in the atlantic flyway, 1977-1983, including an H5N2 isolate related to the virulent chicken virus. *Avian Diseases*, 29, 970-985.

de Leeuw, O.S., Hartog, L., Koch, G. & Peeters, B.P. (2003). Effect of fusion protein cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *The Journal of General Virology*, 84, 475-484.

De Marco, M.A., Foni, G.E., Campitelli, L., Raffini, E., Di Trani, L., Delogu, M., Guberti, V., Barigazzi, G. & Donatelli, I. (2003). Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian Diseases*, 47, 861-866.

De Marco, M.A., Campitelli, L., Foni, E., Raffini, E., Barigazzi, G., Delogu, M., Guberti, V., Di Trani, L., Tollis, M. & Donatelli, I. (2004). *Veterinary Microbiology*, 98, 197-208.

Doyle, T.M. (1927). A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filterpassing virus. *Journal of Comparative Pathology*, 40, 144-169.

Echeonwu, G.O.N., Iroegbu, C.U. & Emeruwa, A.C. (1993). Recovery of velogenic Newcastle disease virus from dead and healthy free-roaming birds in Nigeria. *Avian Pathology*, 22, 383-387.

Engvall, E. & Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.

Errington, W., Steward, M. & Emmerson, P.T. (1995). A diagnostic immunoassay for Newcastle disease virus based on the nucleocapsid protein expressed by a recombinant baculovirus. *Journal of Virological Methods*, 55, 357-365.

Estudillo, J. (1972). A Newcastle disease outbreak in captive exotic birds. *Proceedings of 21st Western Poultry Disease Conference and 6th Poultry Health Symposium*, University of California, Davis.

European Food Safety Authority (2007). Review on Newcastle disease focussing on vaccination worldwide in order to determine its optimal use for disease control purposes. Annex to the EFSA Journal (2007) 477, 1-24.

(http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/ahaw_report_newcastle_en.pdf?ssbinary=true)

Fortner, J., Ulbrich, F. & Lessing, G. (1959). Über den Wert der Schutzimpfung gegen die atypische Hühnerpest (Newcastle Disease). *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin*, 13, 499-507.

Fox, J.L., Hazell, S.L., Tobler, L.H. & Busch, M.P. (2006). Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13, 33-36.

French, E.L., St.George, T.D. & Percy, J.J. (1967). Infection of chicks with recently isolated Newcastle disease viruses of low virulence. *The Australian Veterinary Journal*, 43, 404-409.

Friend, M. & Trainer, D.O. (1970). Serologic evidence of Newcastle disease in captive mallards and swans. *Journal of Wildlife Diseases*, 6, 130-135.

Friend, M. & Trainer, D.O. (1972). Experimental Newcastle disease studies in the Mallard. *Avian Diseases*, 16, 700-713.

Frölich, M., Cortez de Jäckel, S. & Selhorst, T. (1992). Tenazität von Newcastle-Disease-Virus (La Sota) in den Exkrementen von Legehennen in unterschiedlichen Haltungssystemen. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 99, 494-499.

Funk, G. (1954). Infektionsversuche mit Newcastle-Disease-Virus an Enten und Entenembryonen. Vet.-med. Diss., Univ. Berlin.

Globig, A. (2007). Untersuchungen zum Vorkommen von aviären Influenza- und aviären Paramyxoviren bei Wildvögeln in Deutschland. Vet.-med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Goddard, R.D., Nicholas, R.A.J. & Luff, P.R. (1988). Serology-based potency test for inactivated Newcastle disease vaccines. *Vaccine*, 6, 530-532.

Gosling, J.P. (1996). Enzyme immunoassay. In E.P. Diamandis & T.K. Christopoulos (Eds.), *Immunoassay* (pp. 287-308). San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.

Gould, A.R., Kattenbelt, J.A., Selleck, P., Hansson, E., Della-Porta, A. & Westbury, H.A. (2001). Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Research*, 77, 51-60.

Gould, A.R., Hansson, E., Selleck, K., Kattenbelt, J.A., Mackenzie, M. & Della-porta, A.J. (2003). Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motifs as markers for viral lineage. *Avian Pathology*, 32, 361-373.

Granzow, H., Weiland, F., Mundt, E., Köllner, B. & Werner, O. (1999). Intranuclear inclusions in cells infected with Newcastle disease virus. *Journal of Veterinary Medicine B*, 46, 411-421.

Greiner, M., Sohr, D. & Göbel, P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal of Immunological Methods*, 185, 123-132.

Grotjan, H.E. & Keel, B.A. (1996). Data interpretation and quality control. In E.P. Diamandis & T.K. Christopoulos (Eds.), *Immunoassay* (pp. 51-93). San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.

Grund, C., Scharr, H. & Kösters, J. (1997). Immunisierung von Enten, Gänsen, Perlhühnern, Wachteln und Tauben mit einem Ölemulsionsimpfstoff (Newcavac® Nobilis) gegen die Newcastle Krankheit. 53. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten der DVG-Fachgruppe „Geflügelkrankheiten“, Hannover 6.-7. November (S. 110-121).

Häuslaigner, R., Sonnenburg, J., Kothlow, S., Kaspers, B., Staubach, C. & Grund, C. (2009). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to study the specific humoral immune response of Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser var. domestica*) after vaccination against Newcastle disease virus. *Avian Pathology*, 38, 89-95 (<http://www.informaworld.com>).

Hawkes, R., Niday, E. & Gordon, J. (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical Biochemistry*, 119, 142-147.

Heckert, R.A., Collins, M.S., Manvell, R.J., Strong, I., Pearson, J.E. & Alexander, D.J. (1996). Comparison of Newcastle disease viruses isolated from cormorants in Canada and the USA in 1975, 1990 and 1992. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 60, 50-54.

Heider, G. & Monreal, G. (1992). *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels* Band I und II. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Heller, O. (1957). Beitrag zur Epidemiologie der Hühnerpest: Gänse als latente Virusträger. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, 12, 218-219.

Higgins, D.A. (1971). Nine disease outbreaks associated with myxoviruses among ducks in Hong Kong. *Tropical Animal Health and Production*, 3, 232-240.

Hinshaw, V.S., Webster, R.G. & Turner, B. (1980). The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Canadian Journal of Microbiology*, 26, 622-629.

Hirst, G.K. (1941). The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*, 94, 22-23.

Hlinak, A., Ziedler, K. & Heiss, R. (1992a). Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen das Newcastle Disease Virus bei Wassergeflügel mittels Hämagglutinationshemmungs-Test und Enzym-Immuno-Assay. *Journal of Veterinary Medicine B*, 39, 641-648.

Hlinak, A., Dahms, H. & Minning, P. (1992b). Beitrag zur Wertung verschiedener Testmethoden zum Nachweis von Antikörpern gegen das Newcastle Disease Virus. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, 47, 443-447.

Hlinak, A., Müller, T., Kramer, M., Mühle, R.U., Liebherr, A. & Ziedler, K. (1998). Serological survey of viral pathogens in bean and white-fronted geese from Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 34, 479-486.

Hlinak, A., Mühle, R.U., Werner, O., Globig, A., Starick, E., Schirrmeier, H., Hoffmann, B., Engelhardt, A., Hübner, D., Conraths, F.J., Wallschläger, D., Kruckenberg, H. & Müller, T. (2006). A virological survey in migrating waders and other waterfowl in one of the most important resting sites of Germany. *Journal of Veterinary Medicine B*, 53, 105-110.

Hopkins, B.A., Skeeles, J.K., Houghten, G.E., Slagle, D. & Gardner, K. (1990). A survey of infectious diseases in wild turkeys (*Meleagris gallopavo silvestris*) from Arkansas. *Journal of Wildlife Diseases*, 26, 468-472.

Hore, D.E., Campbell, J. & Turner, A.J. (1973). A serological survey for viral antibodies in wild ducks. *The Australian Veterinary Journal*, 49, 238-239.

Hudson, L. & Hay, F.C. (1989). *Practical Immunology* (pp. 342-352). Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Paris, Berlin, Vienna: Blackwell Scientific Publications.

Huovilainen, A., Ek-Kommonen, C., Manvell, R. & Kinnunen, L. (2001). Phylogenetic analysis of avian paramyxovirus 1 strains isolated in Finland. *Archives of Virology*, 146, 1775-1785.

Islam, M.A., Ito, T., Takakuwa, H., Takada, A., Itakura, C., & Kida, H. (1994). Acquisition of pathogenicity of a Newcastle disease virus isolated from a Japanese quail by intracerebral passage in chickens. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 42, 147-156.

Iyer, S.G. (1945). The susceptibility of ducks to Newcastle (Ranikhet) disease. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 15, 165-166.

Jacobi, H.-W. (1982). Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von Paramyxovirusinfektionen bei Puten, Enten und Gänsen in der Bundesrepublik Deutschland. Vet.-med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Jacotot, H. (1950). Peste aviaire et maladie de Newcastle. Systématique et terminologie. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 23, 249-254.

Jørgensen, P.H., Handberg, K.J., Ahrens, P., Therkildsen, O.R., Manvell, R.J. & Alexander, D.J. (2004). Strains of avian paramyxovirus type 1 of low pathogenicity for chickens isolated from poultry and wild birds in Denmark. *The Veterinary Record*, 154, 497-500.

Kaleta, E.F. (1992). Newcastle Krankheit. In G. Heider & G. Monreal (Hrsg.), *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels* Band I (S. 590-624). Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Kaleta, E.F. & Baldauf, C. (1988). Newcastle disease in free-living and pet birds. In D.J. Alexander (Ed.), *Newcastle Disease* (pp. 197-246). Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.

Kaleta, E.F., Bolte, A.L., Altmann, S. & Bernius, E. (1999). Newcastle disease (ND) in waterfowl. *Proceedings 1st World Waterfowl Conference, Taiwan, R.O.C.*, 215-232.

Kapczynski, D.R. & King, D.J. (2005). Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*, 23, 3424-3433.

Kardi, V. & Szegletes, E. (1996). Use of ELISA procedures for the detection of Derzsy's disease virus of geese and of antibodies produced against it. *Avian Pathology*, 25, 25-34.

Kawamura, M., Mikami, T., Kodama, H. & Izawa, H. (1987). Pathogenicity and immunogenicity in chickens of Newcastle disease viruses isolated from wild ducks. *Archives of Virology*, 95, 149-156.

Kelleher, C.J., Halvorson, D.A., Newman, J.A. & Senne, D.A. (1985). Isolation of avian paramyxoviruses from sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Diseases*, 29, 400-407.

Keller, R. (1994). *Immunologie und Immunpathologie* 4th edn (chapter 8). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

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

King, D.J. & Seal, B.S. (1998). Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus (NDV) field isolates with comparisons to reference NDV strains. *Avian Diseases*, 42, 507-516.

Kirkland, P.D. (2000). Virulent Newcastle disease virus in Australia: in through the 'back door'. *The Australian Veterinary Journal*, 78, 331-333.

Kohn, A. (1955). Quantitative aspects of Newcastle disease virus infection – effect of route of infection and the susceptibility of chicks. *American Journal of Veterinary Research*, 16, 450-457.

Kothlow, S., Mannes, N.K., Schaerer, B., Rebeski, D.E., Kaspers, B. & Schultz, U. (2005). Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies. *Developmental and Comparative Immunology*, 29, 733-748.

Kothlow, S., Häuslaigner, R., Kaspers, B. & Grund, C. (2008). Evaluation of Newcastle disease virus immunoassays for waterfowl using a monoclonal antibody specific for the duck immunoglobulin light chain. *Avian Pathology*, 37, 323-328 (<http://www.informaworld.com>).

Kuby, J. (1997). *Immunology* 3rd edn, Part II (chapter 5). New York: W.H. Freeman and Company.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lamb, R.A. & Kolakofsky, D. (2001). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In D.M. Knipe & P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology* 4th edn, vol. 1 (pp. 1305-1340). Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Company.

Lamb, R.A., Collins, P.L., Kolakofsky, D., Melero, J.A., Nagai, Y., Oldstone, M.B.A., Pringle, C.R. & Rima, B.K. (2005). Family Paramyxoviridae. In C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball (Eds.), *Virus Taxonomy* Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp. 655-668). Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier-Verlag.

Lancaster, J.E. (1966). *Newcastle disease - a review 1926-1964*. Monograph 3, Canadian Department of Agriculture, Ottawa.

Lancaster, J.E. & Alexander, D.J. (1975). *Newcastle Disease virus and spread. A review of some of the literature*. Monograph 11, Canadian Department of Agriculture, Ottawa.

Leslie, J. (2000). Newcastle disease: outbreak losses and control policy costs. *The Veterinary Record*, 146, 603-606.

Lindh, E., Huovilainen, A., Rätti, O., Ek-Kommonen, C., Sironen, T., Huhtamo, E., Pöysä, H., Vaheri, A. & Vapalahti, O. (2008). Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland. *Virology Journal*, 5: 35 (<http://www.virologyj.com/content/pdf/1743-422X-5-35.pdf>).

Liu, X.F., Wan, H.Q., Ni, X.X., Wu, Y.T. & Liu, W.B. (2003). Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Archives of Virology*, 148, 1387-1403.

Lockaby, S.B., Hoerr, F.J., Ellis, A.C. & Yu, M.S. (1993). Immunohistochemical detection of Newcastle disease virus in chickens. *Avian Diseases*, 37, 433-437.

Lomniczi, B. (1975). Thermostability of Newcastle disease virus strains of different virulence. *Archives of Virology*, 47, 249-255.

Lomniczi, B., Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A., Kaleta, E.F., Werner, O., Meulemans, G., Jorgensen, P.H., Manté, A.P., Gielkens, A.L.J., Capua, I. & Damoser, J. (1998). Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of Virology*, 143, 49-64.

Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. (2006). *Der Experimentator: Immunologie*, 2.Auflage. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.

Mackenzie, J.S., Edwards, E.C., Holmes, R.M. & Hinshaw, V.S. (1984). Isolation of orthomyxo- und paramyxoviruses from wild birds in western Australia, and the characterisation of novel influenza A viruses. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 62, 89-99.

Macpherson, L.W. (1956). Some observation on the epizootiology of Newcastle disease. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 20, 155-168.

Maestrone, G. & Coffin, D.L. (1964). Study of Newcastle disease by means of fluorescent antibody technique. *American Journal of Veterinary Research*, 25, 217-223.

Majiyagbe, K.A. & Nawathe, D.R. (1981). Isolation of virulent Newcastle disease virus from apparently normal ducks in Nigeria. *The Veterinary Record*, 108, 190.

Makkay, A.M., Krell, P.J. & Nagy, É. (1999). Antibody detection-based differential ELISA for NDV-infected or vaccinated chickens versus NDV HN-subunit vaccinated chickens. *Veterinary Microbiology*, 66, 209-222.

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

Maldonado, A., Arenas, A., Tarradas, M.C., Luque, I., Astorga, R., Perea, J.A. & Miranda, A. (1995). Serological survey for avian paramyxoviruses from wildfowl in aquatic habitats in Andalusia. *Journal of Wildlife Diseases*, 31, 66-69.

Mann, J.J., Rossen, R.D., Lehrich, J.R. & Kasel, J.A. (1967). The effect of kaolin on immunoglobulins: an improved technique to remove the nonspecific serum inhibitor of reovirus haemagglutination. *The Journal of Immunology*, 98, 1136-1142.

Marius-Jestin, V., Cherbonnel, M., Picault, J.P. & Bennejean, G. (1987). Isolement chez des canards mulards d'une souche hypervirulente de virus de la Peste du canard et d'un paramyxovirus aviaire de type 6. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 10, 173-186.

Marquardt, W.W., Snyder, D.B., Savage, P.K., Kadavil, S.K. & Yancey, F.S. (1985). Antibody response to Newcastle disease virus given by two different routes as measured by ELISA and

hemagglutination-inhibition test and associated tracheal immunity. *Avian Diseases*, 29, 71-79.

Martin, S.W., Meek, A.H. & Willeberg, P. (1987). *Veterinary epidemiology: principles and methods* (pp. 48-76). Ames, Iowa: Iowa State University Press.

Matumoto, M. (1969). Mechanism of perpetuation of animal viruses in nature. *Bacteriological Reviews*, 33, 404-418.

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. & Wittmann, G. (1977). *Virologische Arbeitsmethoden* Band II, Serologie. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.

McFerran, J.B. & McCracken, R.M. (1988). Newcastle Disease. In D.J. Alexander (Ed.), *Newcastle Disease* (pp. 161-183). Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.

Miers, L.A., Bankowski, R.A. & Zee, Y.C. (1983). Optimizing the enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunity of chickens to Newcastle disease. *Avian Diseases*, 27, 1112-1125.

Mikami, T., Izawa, H., Kodama, H., Onuma, M., Sato, A., Kobayashi, S., Ishida, M. & Nerome, K. (1982). Isolation of ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks in Hokkaido. *Archives of Virology*, 74, 211-217.

Miller, L.E., Ludke, H.R., Peacock, J.E., Tomar, R.H. (1991). *Manual of Laboratory Immunology* 2nd edn. Philadelphia, London: Lea & Febiger.

Miranda, A. (1995). Serological survey for avian paramyxoviruses from wildfowl in aquatic habitats in Andalusia. *Journal of Wildlife Diseases*, 31, 66-69.

Mohan, C.M., Dey, S., Rai, A. & Kataria, J.M. (2006). Recombinant haemagglutinin neuraminidase antigen-based single serum dilution ELISA for rapid serological profiling of Newcastle disease virus. *Journal of Virological Methods*, 138, 117-122.

Müller, T., Hlinak, A., Mühle, R.U., Kramer, M., Liebherr, H., Ziedler, K. & Pfeiffer, D.U. (1999). A descriptive analysis of the potential association between migration patterns of bean and white-fronted geese and the occurrence of Newcastle disease outbreaks in domestic birds. *Avian Diseases*, *43*, 315-319.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999). Laboratory diagnosis of viral diseases. In F.A. Murphy, E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek & M.J. Studdert (Eds.), *Veterinary Virology* 3rd edn (pp. 193-223). Oxford: Elsevier.

Netski, D.M., Mosbrugger, T., Depla, E., Maertens, G., Ray, S.C., Hamilton, R.G., Roundtree, S., Thomas, D.L., McKeating, J. & Cox, A. (2005). Humoral immune response in acute Hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases*, *41*, 667-675.

Nettles, V.F., Wood, J.M. & Webster, R.G. (1985). Wildlife surveillance associated with an outbreak of lethal H5N2 avian influenza in domestic poultry. *Avian Diseases*, *29*, 733-741.

Ng, P.L.K. & Higgins, D.A. (1986). Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*). I. preliminary characterization and ontogeny. *Immunology*, *58*, 323-327.

O'Beirne, A.J. & Sever, J.L. (1992). Enzyme immunoassay. In S. Specter & G. Lancz (Eds.), *Clinical Virology Manual* 2nd edn (pp. 153-170). New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier-Verlag.

Oberdörfer, A. & Werner, O. (1998). Newcastle disease virus: detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. *Avian Pathology*, *27*, 237-243.

Office International des Epizooties (2008). Newcastle disease. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 6th edn, vol. 1 (pp.576-589). Paris: OIE.

Ottis, K. & Bachmann, P.A. (1983). Isolation and characterization of ortho- and paramyxoviruses from feral birds in Europe. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, *30*, 22-35.

Page, C.A. (1958). Antibody response of the Canada goose to the Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 2, 365-369.

Palmer, S.F. & Trainer, D.O. (1970). Serologic evidence of Newcastle disease virus in Canada geese. *Avian Diseases*, 14, 494-502.

Pearson, G.L. & McCann, M.K. (1975). The role of indigenous wild, semidomestic, and exotic birds in the epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1972-1973. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 167, 610-614.

Pfizer, S., Verwoerd, D.J., Gerdes, G.H., Lauschagne, A.E., Erasmus, A., Manvell, R.J. & Grund, C. (2000). Newcastle disease and avian influenza A virus in wild waterfowl with particular reference to the risks of transmission to ostriches in the Little Karoo, South Africa. *Avian Diseases*, 44, 655-660.

Piela, T.H. & Yates, V.J. (1983). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with hemagglutination-inhibition and immunodiffusion tests for detection of antibodies to a hemagglutinating duck adenovirus in chickens. *Avian Diseases*, 27, 724-730.

Reno, P.W. & Hoffmann, E.M. (1972). Enhancement of haemagglutination inhibition by complement. *Infection and Immunity*, 6, 945-951.

Reynolds, D.L. & Maraqa, A.D. (2000). Protective immunity against Newcastle disease: the role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. *Avian Diseases*, 44, 138-144.

Riggs, J.L., Seiwald, R.J., Burckhalter, J.H., Downs, C.M. & Metcalf, T.G. (1958). Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum. *The American Journal of Pathology*, 34, 1081-1097.

Rosenberger, J.K., Krauss, W.C. & Slemons, R.D. (1974). Isolation of Newcastle disease and type-A influenza viruses from migratory waterfowl in the atlantic flyway. *Avian Diseases*, *18*, 610-613.

Rott, R., & Klenk, H.D. (1988). Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. In D.J. Alexander (Ed.), *Newcastle disease* (pp. 98-112). Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.

Sachs, L. & Hedderich, J. (2006). *Angewandte Statistik* 12. Ausgabe. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K. & Swayne, D.E. (2008). *Diseases of Poultry* 12th edn. Iowa, Oxford, Victoria: Blackwell Publishing.

Sakai, K., Sakabe, G., Tani, O., Watanabe, Y., Jahangir, A., Nakamura, M. & Takehara, K. (2007). Characterization of Newcastle disease virus isolated from northern pintail (*Anas acuta*) in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *69*, 1307-1311.

Schelling, E., Thür, B., Griot, C. & Audigé, L. (1999). Epidemiological study of Newcastle disease in backyard poultry and wild bird populations in Switzerland. *Avian Pathology*, *28*, 263-272.

Sharp, G.B., Kawaoka, Y., Wright, S.M., Turner, B., Hinshaw, V. & Webster, R.G. (1993). *Epidemiology and Infection*, *110*, 161-176.

Shengqing, Y., Shinya, K., Otsuki, K., Ito, H. & Ito, T. (2002a). Isolation of myxoviruses from migratory waterfowls in San-in district, western Japan in winters of 1997-2000. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *64*, 1049-1052.

Shengqing, Y., Kishida, N., Ito, H., Kida, H., Otsuki, K., Kawaoka, Y. & Ito, T. (2002b). Generation of velogenic Newcastle Disease viruses from a non-pathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology*, *301*, 206-211.

Shortridge, K.F. (1978). Newcastle disease virus surveillance in Hong Kong on local and imported poultry. *Research in Veterinary Science*, 25, 204-206.

Shortridge, K.F., Alexander, D.J. & Collins, M.S. (1980). Isolation and properties of viruses from poultry in Hong Kong which represent a new (sixth) distinct group of avian paramyxoviruses. *The Journal of General Virology*, 49, 255-262.

Siegmann, O. (1993). *Kompendium der Geflügelkrankheiten* 5. Auflage. Berlin, Hamburg: Paul Parey-Verlag.

Snyder, D.B., Marquardt, W.W., Mallinson, E.T. & Russek, E. (1983). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. *Avian Diseases*, 27, 161-170.

Spalatin, J. & Hanson, R.P. (1975). Epizootiology of Newcastle disease in waterfowl. *Avian Diseases*, 19, 573-582.

Stallknecht, D.E., Senne, D.A., Zwank, P.J., Shane, S.M. & Kearney, M.T. (1991). Avian paramyxoviruses from migratory and resident ducks of coastal Louisiana. *Journal of Wildlife Diseases*, 27, 123-128.

Stanislawek, W.L., Meers, J., Wilks, C., Horner, G.W., Morgan, C. & Alexander, D.J. (2001). A survey for paramyxoviruses in caged birds, wild birds, and poultry in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 49, 18-23.

Stanislawek, W.L., Wilks, C.R., Meers, J., Horner, G.W., Alexander, D.J., Manvell, R.J., Kattenbelt, J.A. & Gould, A.R. (2002). Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. *Archives of Virology*, 147, 1287-1302.

Styk, B. (1965). Cofactor and specific antibodies against influenza viruses. XI. Mechanism of the action of antibody cofactor. *Acta Virologica*, 9, 210-218.

Swayne, D.E. & Halvorson, D.A. (2008). Influenza. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry* 12th edn (pp. 75-100). Iowa, Oxford, Victoria: Blackwell Publishing.

Takakuwa, H., Ito, T., Takada, A., Okazaki, K. & Kida, H. (1998). Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 45, 207-215.

Takehara, K., Nakata, T., Takizawa, K., Limn, C.K., Mutoh, K. & Nakamura, M. (1999). Expression of goose parvovirus VP1 capsid protein by a baculovirus expression system and establishment of fluorescent antibody test to diagnose goose parvovirus infection. *Archives of Virology*, 144, 1639-1645.

Telbis, C., Neumann, U. & Siegmann, O. (1989). Vorkommen von Paramyxoviren bei Wildvögeln: Epizootiologische Aspekte, Eigenschaften in vivo und in vitro. *Journal of Veterinary Medicine B*, 36, 203-216.

Tůmová, B., Turek, R., Kubínová, I., Štumpa, A., Čiampor, F. (1984). Incidence of paramyxoviruses in free-living birds in 1978-1982. *Acta Virologica*, 28, 114-121.

Turpin, E.A., Stallknecht, D.E., Slemons, R.D., Zsak, L. & Swayne, D.E. (2008). Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathology*, 37, 343-351.

Tyrrell, D.A.J. & Horsfall, F.L. (1952). A procedure which eliminates nonspecific inhibitor from human serum but does not affect specific antibodies against influenza viruses. *The Journal of Immunology*, 69, 563-574.

van Boven, M., Bouma, A., Fabri, T.H.F., Katsma, E., Hartog, L. & Koch, G. (2008). Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathology*, 37, 1-5.

Vickers, M.L. & Hanson, R.P. (1982a). Newcastle disease virus in waterfowl in Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases*, *18*, 149-158.

Vickers, M.L. & Hanson, R.P. (1982b). Characterisation of isolates of Newcastle disease virus from migratory birds and turkeys. *Avian Diseases*, *26*, 127-133.

Wachendörfer, G. (1965). Präzipitinogen und präzipitierende Antikörper bei der Newcastle-Krankheit. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, *8*, 176-181.

Wan, H., Chen, L., Wu, L. & Liu, X. (2004). Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection. *Avian Pathology*, *33*, 216-221.

Wang, C.-Y., Shieh, H.K., Shien, J.-H., Ko, C.-Y. & Chang, P.-C. (2005). Expression of capsid proteins and non-structural proteins of waterfowl parvoviruses in *Escherichia coli* and their use in serological assays. *Avian Pathology*, *34*, 376-382.

Webster, R.G., Morita, M., Pridgen, C. & Tumova, B. (1976). Ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks: characterization of a new group of influenza A viruses. *The Journal of General Virology*, *32*, 217-225.

Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A. & Lomniczi, B. (1997). Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains LaSota and B-1 by restriction site analysis of their matrix gene. *Vaccine*, *15*, 1430-1433.

Weidenmüller, H. (1972). Newcastle-Krankheit bei Gänsen. *Tierärztliche Umschau*, *27*, 280-282.

Werner, O. (1988). Newcastle Disease (ND). In T. Blaha (Hrsg.), *Angewandte Epizootiologie und Tierseuchenbekämpfung* (S. 84-87). Jena: Fischer-Verlag.

Westbury, H. (2001). Newcastle disease virus: an evolving pathogen? *Avian Pathology*, *30*, 5-11.

Williams, J.E. & Dillard, L.H. (1968). Penetration patterns of *Mycoplasma gallisepticum* and Newcastle disease virus through the outer structures of chicken eggs. *Avian Diseases*, 12, 650-657.

Wilson, R.A., Perrotta, C.J., Frey, B. & Eckroade, R.J. (1984). An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. *Avian Diseases*, 28, 1079-1085.

Winmill, A.J. & Haig, D.A. (1961). Observations on Newcastle disease in Kenya. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 9, 365-369.

Wobeser, G.A. (1997). *Diseases of wild waterfowl* 2nd edn. New York, London: Plenum Press.

Wobeser, G., Leighton, F.A., Norman, R., Myers, D.J., Onderka, D., Pybus, M.J., Neufeld, J.L., Fox, G.A. & Alexander, D.J. (1993). Newcastle disease in wild water birds in western Canada, 1990. *Canadian Veterinary Journal*, 34, 353-359.

Xu, M., Chang, S., Ding, Z., Gao, H.-W., Wan, J.-Y., Liu, W.-S., Liu, L.-N., Gao, Y. & Xu, J. (2008). Genomic analysis of Newcastle disease virus strain NA-1 isolated from geese in China. *Archives of Virology*, 153, 1281-1289.

Zanetti, F., Berinstein, A., Pereda, A., Taboga, O. & Carrillo, E. (2005). Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. *Avian Diseases*, 49, 546-550.

Zhao, X., Phillips, R.M., Li, G. & Zhong, A. (1991). Studies on the detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Diseases*, 35, 778-782.

Ziedler, K. & Hlinak, A. (1993). Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Newcastle Disease bei Wildvögeln. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 106, 302-305.

Ziedler, K., Hlinak, A., Raetz, G., Werner, O. & Ebner, D. (1995). Untersuchungen zum Antikörperstatus von Wild- und Zoovögeln gegen ausgewählte Nutztier-relevante Erreger. *Journal of Veterinary Medicine B*, 42, 321-330.

Zimmerman, B., Shalatin, N. & Grey, H.M. (1971). Structural studies on the duck 5.7S and 7.8S immunoglobulins. *Biochemistry*, 10, 482-488.

Zweig, M.H. & Campbell, G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry*, 39, 561-577.

8 ANHANG

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. In serologischen Studien ermittelte Antikörper-Vorkommen gegen APMV-1 beim Wassergeflügel

Tabelle 2. In virologischen Studien ermitteltes Vorkommen von APMV-1 bzw. APMV beim Wassergeflügel

Tabelle 3a. Virale Differentialdiagnosen zur Newcastle Disease beim Wassergeflügel

Tabelle 3b. Bakterielle Differentialdiagnosen zur Newcastle Disease beim Wassergeflügel

Tabelle 4. Enzyme, Substrate, Stopplösungen und Messwellenlängen für den ELISA (modifiziert nach Luttmann *et al.*, 2006)

Tabelle 5. Vor- und Nachteile serologischer Testverfahren

Tabelle 6. Beim Wassergeflügel zum Einsatz kommende serologische Testverfahren

Veröffentlichung Nr.1

Table 1. Phylogenetic tree of eight selected waterfowl species, which were used to test the cross-reactivity of mAb 14A3 (Wolters, 1982)

Veröffentlichung Nr.2

Table 1. Statistical parameters calculated by taking the HI test, HI test and western blot (WB), or the vaccination status as the reference standard

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Testprinzip des HAH

Abbildung 2. Testprinzip des indirekten bzw. kompetitiven ELISA

Abbildung 3. Testprinzip des indirekten IF-Tests

Abbildung 4. Testprinzip des WB

Veröffentlichung Nr.1

Figure 1. Cross-reactivity of mAb 14A3 with the light chain of IgG from different waterfowl species

Figure 2. Suitability of mAb 14A3 to facilitate the detection of substrate bound antibodies in the indirect immunofluorescence test

Figure 3. APMV-1 ELISA using mAb 14A3 as secondary antibody

Figure 4. APMV-1-specific reactivity of goose and duck sera, confirmed by WB

Veröffentlichung Nr.2

Figure 1. Antibody response of ducks and geese after ND vaccination

Figure 2. Repeatability of the APMV ELISA

Figure 3. Correlation of ELISA and HI test results

Figure 4. Western blot analysis of sera with the same HI titre but different ELISA reactivity

DANKSAGUNG

Allen, die zur Entstehung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, spreche ich meinen herzlichen Dank aus.

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. habil. Ch. Grund für die Überlassung des Themas, die Einarbeitung in die Virologie und die Ermöglichung der Fertigstellung der Arbeit am Friedrich-Loeffler-Institut. Bedanken möchte ich mich auch für seine geduldige und nette Art, mit der er mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. habil. R. Korbel danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes in der virologischen Abteilung der Klinik für Vögel der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie die Ermöglichung vielfältiger Weiterbildung.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Th. Mettenleiter und Herrn PD Dr. M. Beer, die mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Arbeit am Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems zu vollenden.

Vielen Dank auch an Frau Dr. S. Kothlow und Herrn Prof. Dr. B. Kaspers, für die zur Verfügungstellung des monoklonalen Antikörpers und die gute Zusammenarbeit bei der Anfertigung der Publikationen.

Mein besonderer Dank gilt auch Jana Sonnenburg und Dr. Ch. Staubach vom Friedrich-Loeffler-Institut in Wusterhausen für ihr großes Engagement bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse und die angenehme Zusammenarbeit bei der Erstellung der zweiten Publikation.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Dr. A. Fröhlich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und bei Dr. T. C. Harder für das Korrekturlesen des Hauptautorartikels.

Bei allen Mitarbeitern der Klinik für Vögel der Ludwig-Maximilians-Universität sowie des Friedrich-Loeffler Instituts bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima. Meinen unmittelbaren Mitstreiterinnen Beate Köhler, Iris Daum, Isabel Sahn, Eva Huthmann, Inge Müller, und Regula Wäckerlin danke ich für die schönen, heiteren Stunden und die gegenseitige Unterstützung.

Meinen Freundinnen Anja Globig und Anja Bischoff danke ich herzlich für die aufbauenden Gespräche, die guten Ratschläge und die wunderschönen Verschnaufpausen neben der Doktorarbeit.

Meinem Freund Axel für seine Liebe, seine Geduld und sein Verständnis, insbesondere in den letzten anstrengenden Monaten der Abgabezeit.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern, für ihre beständige Unterstützung und ihre unheimliche Geduld, mit der sie sich meiner Sorgen und Probleme angenommen haben. Meinen Schwestern, ebenso wie meiner Mutter, danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit bzw. dafür, dass sie mich die ganze Zeit über bei guter Laune gehalten haben.