

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Zoologische Einrichtungen

Das Untersuchungsmaterial stammte aus zehn zoologischen Gärten in Deutschland und einem in der Tschechischen Republik (Abb. 7). Um ausreichend Proben je Einrichtung zu erhalten, erfolgte die Auswahl nach ihrer Größe sowie ihres Huftierbestandes (Tab. 4).



Abb. 7: An der Studie beteiligte zoologische Gärten in Deutschland (◆) und in der Tschechischen Republik (◆)

**Tab. 4: Fläche in Hektar (ha) der zoologischen Gärten**

<b>Zoologische Einrichtung</b>	<b>Fläche<sup>1</sup> (ha)</b>
Zoologischer Garten Berlin	33
Tierpark Berlin-Friedrichsfelde	160
Zoo Dortmund	28
Zoo Dvůr Králové nad Labem (Tschechische Republik)	63
Zoom-Erlebniswelt Gelsenkirchen	30
Tierpark Hagenbeck, Hamburg	27
Zoo Hannover	21
Zoo Karlsruhe	9
Zoo Leipzig	23
Tiergarten Nürnberg	70
Zoologisch-botanischer Garten Wilhelma, Stuttgart	28

<sup>1</sup>Angaben nach: International Zoo Yearbook Vol. 40 (2006). Zoological Society of London.

### 3.2 Erhobene Daten

Es wurde ein retrospektiver Überblick von epidemiologisch relevanten Daten aus den Jahren 1998 bis 2004 für die gesamten Bestände der elf Zoos an Boviden, Cerviden und Cameliden erstellt (Tab. 5). Die Gehegegrößen im Zoo Karlsruhe, in der Wilhelma in Stuttgart und im Tierpark Berlin wurden von den Kuratoren mitgeteilt. Die Gehegegrößen der restlichen acht Zoos wurden Grundrissplänen entnommen. Die Zahl der Huftiere pro Anlage sowie die Besatzdichte (Huftierdichte) wurden anhand der Tierkartei-Daten für jedes einzelne Jahr berechnet. Zusätzlich wurde eine Zusammenfassung der veterinärmedizinischen Archiv-Befunde seit dem Jahr 1998 aus acht Einrichtungen erstellt.

**Tab. 5: Erhobene epidemiologische Grunddaten und veterinärmedizinische Befunde**

<b>Kategorie</b>	<b>Einzelheiten</b>
<b>Individuelle Tierdaten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tierart</li> <li>• Animal Record Keeping System (ARKS) Nummer</li> <li>• Geschlecht</li> <li>• Geburts- und Todesdatum</li> </ul>
<b>Haltungsformen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anzahl der Einzelart- und Gemeinschaftshaltungen</li> <li>• Flächengröße der Anlagen</li> <li>• Anzahl der Spezies und Individuen pro Anlage</li> </ul>
<b>Veterinärmedizinische Daten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Individuelle pathologische Befunde</li> <li>• Individuelle serologische Befunde</li> <li>• Individuelle mikrobiologische Befunde</li> </ul>

### 3.3 Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurden für diese Arbeit 1152 im Rahmen von Routinemaßnahmen (Transport, Geburtshilfe, Hufpflege usw.) entnommene Blutproben zur Verfügung gestellt. Von diesen Proben stammten 119 von Equiden und 46 von anderen Tierarten, die mit Ungulaten vergesellschaftet waren (Giraffen, Flusspferden, Pekarier, Wasserschweine, Maras). Diese 165 Proben wurden nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, sondern anderen Forschungsprojekten zur Verfügung gestellt: (1) Entwicklung eines speziesunabhängigen kompetitiven ELISA für den Nachweis von Antikörpern gegen *C. burnetii* im Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, Neuherbergerstraße 11, München. (2) Entwicklung eines speziesunabhängigen kompetitiven ELISA für den Nachweis von Antikörpern gegen *Francisella tularensis* (JENZORA et al., 2006) am Robert Koch-Institut, Center for Biological Safety 2, Nordufer 20, Berlin. (3) Messung der Bindungsaffinität des in den *C. psittaci*, *C. burnetii*- und *M.pt.*- ELISA-Testkits verwendeten Protein G an das IgG von Wildwiederkäuern bei der Firma IDEXX GmbH, Ludwigsburg (Veröffentlichung in Vorbereitung).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit stützten sich auf zwei taxonomische Familien der Unterordnung Wiederkäuer (Ruminantia), den Bovidae und den Cervidae, sowie eine Familie der Unterordnung Schwielensohler (Tylopoda), den Camelidae (Systematik nach NOWAK, 1999). Eine Auflistung aller an der Untersuchung beteiligten Spezies ist dem Anhang A zu entnehmen. Von diesen drei Familien standen insgesamt 989 Blut- bzw. Serumproben zur Verfügung, von denen vier (0,4%) aufgrund von Hämolyseerscheinungen nicht untersuchungsfähig waren. Die verbleibenden 985 Proben waren für die Analysen geeignet. Sie stammten von 926 verschiedenen Individuen. Von 61 Tieren wurden jeweils zwei Proben eingesandt. Im Folgenden wird nur auf die 926 individuelle Proben eingegangen.

### 3.4 Labordiagnostik

#### 3.4.1 Aufarbeitung und Lagerung der Seren / Plasmen

Nur solche Proben aus der Blutbank wurden untersucht, die ab dem Zeitpunkt der Abnahme durchgehend bei mindestens -20°C gelagert waren. Sie wurden vor Ort abgeholt und in einer Kühltruhe direkt ins IZW transportiert. Für den Versand von frischen Blutproben erhielten die Zootierärzte Luftpolster-Versandtaschen und 5 ml Citratröhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht). Jedes Röhrchen wurde mit Spezies, Geschlecht und ARKS-Nummer des Tieres beschriftet und vor dem Postversand maximal drei Tage im Kühlschrank gelagert. Die Blutproben kamen ein bis drei, spätestens fünf Tage nach Abnahme im IZW an. Hier wurde das Vollblut umgehend 10 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert (Sepatech Megafuge 1 mit

Rotor 2705, Firma Heraeus, Hanau). Nach Abtrennung der zellulären Bestandteile wurde das Plasma bis zur Untersuchung bei -20°C tiefgefroren. Vor dem Einsatz im Virusneutralisationstest (VNT) wurde das Plasma im Verhältnis 1:4 mit Dulbecco's Modified Eagle (DME) Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verdünnt und im Wasserbad 30 Minuten bei 56°C inaktiviert.

### 3.4.2 Zellkulturen

Für die Virusvermehrung sowie für den Neutralisationstest wurden Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) Zellen (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland 20850, USA) verwendet. Das Wachstumsmedium für die MDBK-Zellen enthielt 10% fetales Kälberserum (FKS) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), das Erhaltungsmedium 5% FKS. Die Zellzucht erfolgte in 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Nunc GmbH, Wiesbaden) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 70-80% Luftfeuchtigkeit (Begasungsbrutschrank BB 16 Functionline, Firma Heraeus, Berlin). Nachdem die Zellen zu Monolayern dichtgewachsen waren, wurden sie unter Einwirkung von Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, mehrmals resuspendiert und 1:4 bis 1:10 mit Wachstumsmedium verdünnt.

### 3.4.3 Virusvermehrung, Virustitration

Die Vermehrung von BHV-1, CHV-1, HVC-1 sowie den beiden BVDV-Stämmen Grub und SH9/11 erfolgte durch Beimpfen eines konfluenten Zellrasens mit 0,1 infektiösen Einheiten pro Zelle (z.B. 300 µl einer BHV-1-haltigen Virussuspension mit einem Titer von 10<sup>4</sup> KID<sub>50</sub>/ml je 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche). Die Virussuspension wurde 1 Std. bei 37°C inkubiert, um die Adsorption zu ermöglichen (Begasungsbrutschrank, Firma Heraeus). Danach wurde sie mit Erhaltungsmedium überschichtet und je nach Virus zwei bis fünf Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden täglich auf zytopathogene Effekte (zpE) überprüft. Der zpE ist bei BHV-1 und CHV-1 nach zwei Tagen, bei BVDV nach drei bis vier und bei HVC-1 nach etwa fünf Tagen zu erwarten und stellt sich wie folgt dar: Auflockerung des Zellverbandes, Entstehung kleiner Vakuolen im Zytoplasma, Zellzerstörung und schließlich Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche. Auf dem Höhepunkt der Virusvermehrung wurde die Kultur bei -80°C eingefroren. Das Virus wurde durch thermische Beugung (dreimaliges Einfrieren bei -80°C und Auftauen bei Zimmertemperatur) aus den Zellen gewonnen. Das Zellmaterial der zerstörten Zellen wurde bei 4000 U/min, 10 min bei +4°C abzentrifugiert (Biofuge fresco, Firma Heraeus, Hanau). Das auf diese Weise grob gereinigte Virus wurde portioniert und bei -80°C tiefgefroren. Tabelle 6 dokumentiert die dabei erreichten Titer (PFU= Plaque Forming Units, Plaque bildende Einheiten).

**Tab. 6: Titer der für den VNT eingesetzten Virusstämme**

Virusstamm	Erreichter Titer (PFU= Plaque Forming Units)
BHV-1	$6,0 \times 10^7$ PFU / ml
CHV-1	$1,15 \times 10^7$ PFU / ml
HVC-1	$2,4 \times 10^7$ PFU / ml
BVD-Stamm Grub 313/83	$10^{4,5}$ PFU / 100 $\mu$ l
BVD-Stamm SH9/11	$10^4$ PFU / 100 $\mu$ l

Vor dem Einsatz im VNT wurden die Viren schonend aufgetaut und in  $\log_{10}$ -Schritten von  $10^0$  bis  $10^6$  titriert. Dafür wurden je 100  $\mu$ l jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz auf 24-Lochplatten (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) pipettiert und je 100  $\mu$ l Zellsuspension (ca.  $3 \times 10^5$  Zellen/ml) hinzugegeben. Der Reaktionssatz wurde bei 37°C für eine für das jeweilige Virus spezifische Zeit im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Titerberechnung erfolgte nach SPAERMANN und KÄRBER (1985) als kulturinfektiöse Dosis 50% (KID<sub>50</sub>). Die für den VNT benötigte Zahl der kulturinfektiösen Dosen (KID<sub>50</sub>) wurde durch Verdünnung der Viruslösung eingestellt und in einer Kontrolltitration überprüft. Nur Virusverdünnungen, die zwischen 700 und 1000 KID<sub>50</sub>/ml aufwiesen, wurden im VNT verwendet.

### 3.4.4 Testverfahren

#### 3.4.4.1 Virusneutralisationstest (VNT)

Für den Nachweis von Antikörpern gegen BHV-1, CHV-1, HVC-1 und BVDV wurde der VNT durchgeführt.

Prinzip: Der Neutralisationstest basiert auf der Fähigkeit von neutralisierenden Antikörpern, zpE in Zellkulturen zu verhindern (siehe Abb. 8). Der Antikörpertiter wird durch logarithmische Verdünnung der Seren im Vergleich zu einem negativen Standardserum bestimmt.

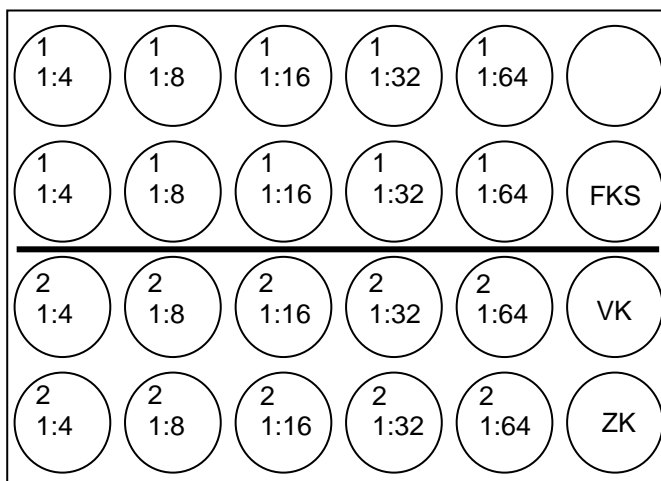
##### 3.4.4.1.1 VNT für BHV-1, CHV-1 und HVC-1 spezifische Antikörper

Der VNT für den Nachweis von Antikörpern gegen Alphaherpesviren wurde auf 24 Well-Flachbodenplatten (Firma Nunc) in zwei Schritten durchgeführt. Auf jeder Platte wurden je eine Virus-, FKS- und Zellkontrolle, und in zehn Fällen zusätzlich eine Blindprobe mitgeführt. Im ersten Schritt (Screening) wurde das Serum im Einfachansatz in einer Verdünnung von 1:4 eingesetzt. In alle Wells wurden je 100  $\mu$ l DME Medium mit 2% Penicillin-Streptomycin,

100 µl Serum, sowie 100 µl der zuvor eingestellten Virussuspension zugegeben. Die Platte wurde kurz auf einem Schüttler (IKA Vibrax-VXR) geschüttelt und 1 Std. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl eingestellte Zellsuspension (ca. 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml für BHV-1 und CHV-1 bzw. 3x10<sup>5</sup> Zellen/ml für HVC-1) in jedes Well gegeben und etwa 2 Std. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten wurden sie mit 400 µl CMC-Emulsion (1,6 gr. Carboxymethyl Cellulose (ICN Biochemicals) + 2% FKS/100 ml Medium) überschichtet. Die überschichteten Platten wurden anschließend 2 Tage (BHV-1, CHV-1) bzw. 5 Tage (HVC-1) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Sie wurden täglich mikroskopisch auf zpE kontrolliert.

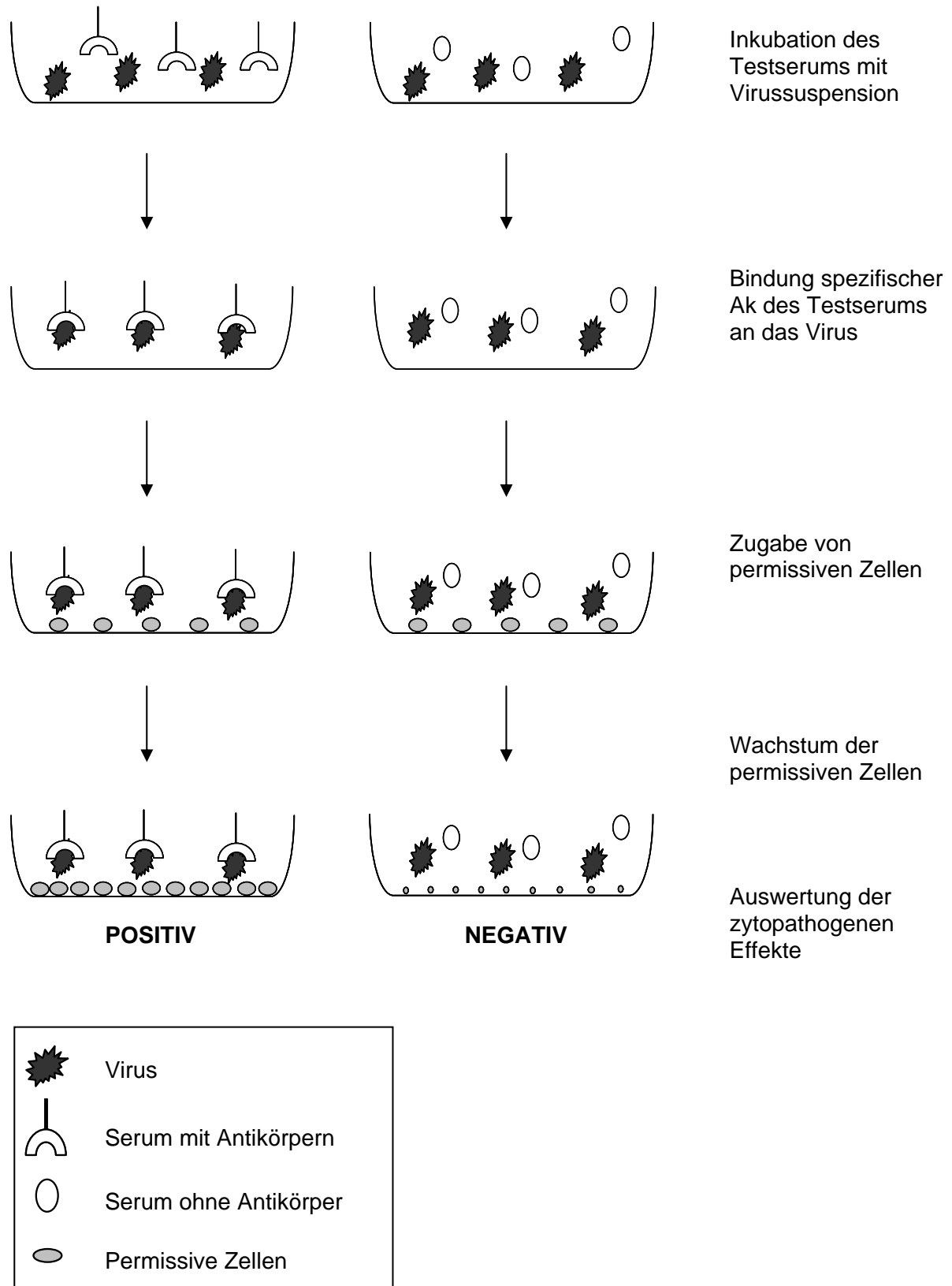
Nach Ablauf der zwei- bis fünftägigen Inkubationszeit wurde der Überstand dekantiert, die Kultur mit einer 3%igen Formalinlösung 25 min fixiert und nach vollständiger Trocknung mit einer 1:20 verdünnten Giemsa-Lösung gefärbt. Die Zellen wurden auf zpE untersucht und diese unter dem Mikroskop gezählt. Der VNT galt als valide, wenn die Positiv- und FKS-Kontrolle jeweils 50 bis 100 zpE zeigten und die Negativ- Kontrolle keinen zpE aufwies.

Als positiv wurden Proben gewertet, die höchstens oder genau die Hälfte der Anzahl zpE der Positivkontrolle zeigten. Diese Proben wurden für die Titerbestimmung (zweiter Schritt) in log<sub>2</sub>-Schritten von 1:4 bis 1:64 verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden wiederum je 100 µl im Doppelansatz zusammen mit 100 µl des auf KID<sub>50</sub> eingestellten Virus eingesetzt (10 Wells / Probe) (Abb. 9). Der Neutralisationstiter wurde definiert als der reziproke Wert derjenigen Verdünnung, bei der eine 50%ige Hemmung des zpE stattgefunden hatte (MAYR et al., 1977).



**Abb. 9: Plattenaufteilung für die Titerbestimmung im VNT für Alphaherpesviren.**

**1-2: fortlaufende Nummer des Testserums (Doppelansatz); 1:4 - 1:64: Verdünnungsstufe des Testserums; FKS: FKS-Kontrolle; VK: Viruskontrolle; ZK: Zellkontrolle.**



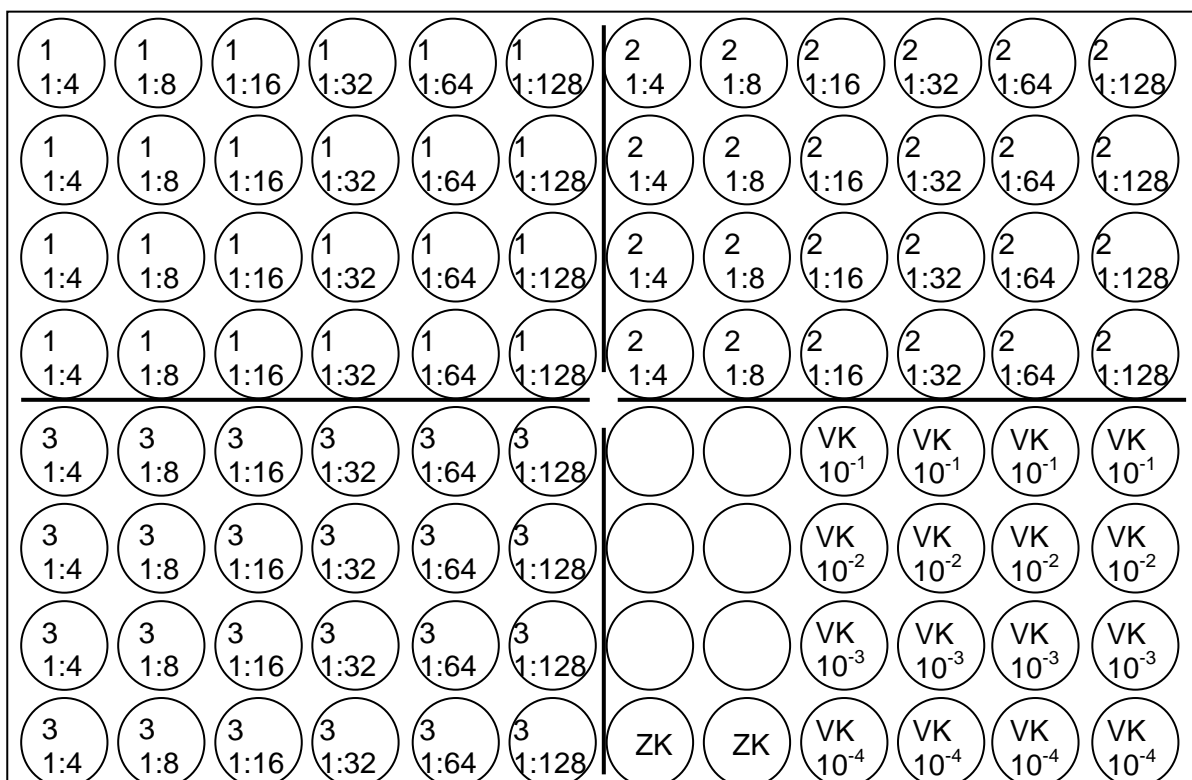
**Abb. 8: Prinzip des VNT für den Nachweis von BHV-1, CHV-1, HVC-1 und BVDV spezifischen Antikörpern**

### 3.4.4.1.2 VNT für BVDV spezifische Antikörper

Für den Nachweis von Antikörpern gegen BVDV wurden in separaten VNT zwei Virusstämme eingesetzt: Grub 313/83 und SH9/11. Der VNT wurde auf 96 Well-Mikrotiterflachbodenplatten (Firma Nunc) durchgeführt. Pro Platte wurden je 2 Zellkontrollen und pro Versuchsansatz eine Virusrücktitration in  $\log_{10}$ -Stufen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  mitgeführt.

Im ersten Schritt (Screening) wurden je 50  $\mu$ l des 1:4 verdünnten Serums und 50  $\mu$ l der eingestellten Virussuspension pro Kavität im Doppelansatz eingesetzt. Die Platte wurde 1 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50  $\mu$ l der eingestellten Zellsuspension (ca.  $3,5 \times 10^5$  Zellen/ml) zugegeben und die Platte vier Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am 4. Tag wurden die Platten mikroskopisch auf zpE untersucht.

Als positiv wurde die Reaktion gewertet, wenn in einer oder in beiden Kavitäten der zpE gehemmt war. Positive Seren wurden für die Titerbestimmung im zweiten Schritt in  $\log_2$ -Schritten von 1:4 bis 1:128 verdünnt. Es wurden je 50  $\mu$ l verdünntes Serum und 50 kulturinfektiöse Dosen (KID<sub>50</sub>) pro Well (50  $\mu$ l Virussuspension) im Vierfachansatz verwendet (Abb. 10). Die Titer wurden nach der Tabelle von SPEARMANN und KÄRBER (1985) als neutralisierende Dosis 50% (ND<sub>50</sub>) berechnet. Als Grenztiter wurde ein Titer von >1:4 gewertet.



**Abb. 10: Plattenaufteilung für die Titerbestimmung im VNT für BVDV. Dabei bedeuten 1-3: fortlaufende Nummer des Testserums (Vierfachansatz); 1:4 - 1:128: Verdünnungsstufe des Testserums; VK: Viruskontrolle; ZK: Zellkontrolle.**



### 3.4.4.2 Kompetitiver ELISA für BKFV assoziierte Antikörper

Für die Detektion von Antikörpern gegen BKFV wurde ein kommerziell erhältlicher kompetitiver ELISA (cELISA) mit dem monoklonalen Antikörper 15-A verwendet. Der Test wurde freundlicherweise von H. LI, United States Department of Agriculture (USDA), Animal Disease Research Unit (ARS), Washington, USA, zur Verfügung gestellt.

Prinzip: Beim kompetitiven ELISA konkurrieren Antikörper im Testserum und Peroxidase (PO)-markierte Antikörper um das an die Testplatten gebundene Antigen (Abb. 11). Nach Zugabe von Enzymsubstrat kann die Menge an gebundenen, markierten Antikörpern nachgewiesen werden. Daraus lässt sich die Menge der Antigen-blockierenden Serum-Antikörper ermitteln.

Die Durchführung des ELISA erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von LI et al. (1994). Zuerst wurden die Test- und Kontrollseren 1:5 mit Verdünnungspuffer verdünnt. Anschließend wurden die mit MCFV Antigen vorbeschichteten Kavitäten der 96 Well Platte gemäß Abb. 12 mit je 50 µl verdünntem Testserum (bzw. positivem und negativem Kontrollserum) beschickt. Pro Platte wurden zwei Wells mit Positivkontrollen und vier Wells mit Negativkontrollen mitgeführt. Zwei Wells wurden nicht beschickt (Blank).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	Pos	Pos	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
C	Neg	Neg	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
D	Neg	Neg	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
E	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
F	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
G	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
H	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88

**Abb. 12: Plattenaufteilung im cELISA. 1-88: fortlaufende Nummer des Testserums (Einfachansatz); Blank: Blank-Wert; Pos: Positivkontrolle; Neg: Negativkontrolle.**

Die Platte wurde luftdicht mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten dreimal mit gebrauchsfertiger Waschlösung gewaschen und Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf ein Papiertuch entfernt. Anschliessend wurden 50 µl des 1:100 mit Verdünnungspuffer verdünnten Antikörper-Peroxidase-Konjugats in jedes Well zugegeben. Die Platte wurde abgedeckt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde sie dreimal mit Waschlösung gewaschen. Danach wurden jeweils 100 µl Substratlösung zugegeben und die Platte 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden jeweils 100 µl Stopplösung zugegeben und die optische Dichte (OD) unmittelbar mit einem ELISA Reader (Sunrise, Firma Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Zur Auswertung wurde der Durchschnitt der OD-Werte der Negativkontrollen ermittelt. Dieser entspricht 100%. Die anderen absoluten OD-Werte wurden in prozentuale OD-Werte umgerechnet.

$$\text{OD\% (Probe)} = \frac{\text{OD (Probe)} \times 100}{\text{Mittlere OD Negativkontrolle}}$$

Der "cut off" lag bei 25%, d.h. als positive Reaktion wurde gewertet, wenn die Farbreaktion mehr als 50% im Vergleich zur Negativkontrolle gehemmt wurde (prozentualer OD-Wert < 25%). Für die Gültigkeit des Tests mussten die Positivkontrollen einen prozentualen OD-Wert von < 25% ergeben.

Da der cELISA nicht unterscheiden kann, welcher BKF-Virustyp die Antikörper-Bildung induziert hat (LI et al., 2001; CHMIELEWICZ et al., 2001), wurden für etwaige Folgestudien zusätzlich zum Plasma die Leukozyten (Buffy coat) von 433 Huftieren isoliert und bei -80°C gelagert.

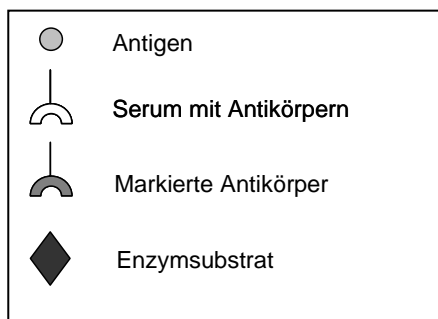
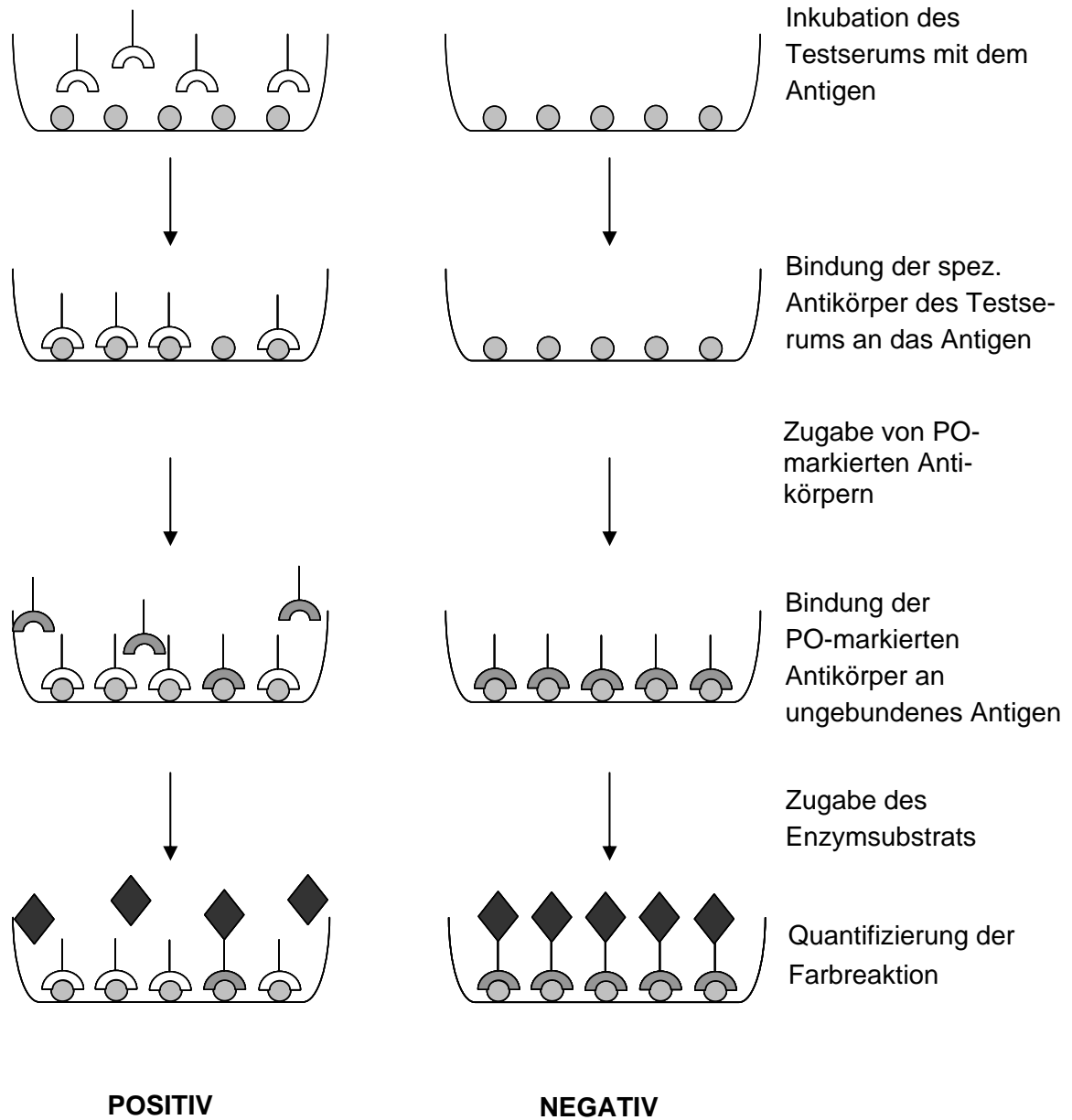


Abb. 11: Prinzip des kompetitiven ELISA für den Nachweis von BKFV assoziierten Antikörpern.

### 3.4.4.3 Indirekter ELISA für *C. psittaci*, *C. burnetii* und *M.pt.* assoziierte Antikörper

Für die Detektion von Antikörpern gegen *C. psittaci*, *C. burnetii* und *M.pt.* wurde ein kommerziell von der Firma IDEXX GmbH, Ludwigsburg, erhältlicher indirekter ELISA verwendet.

Prinzip: Beim indirekten (nicht-kompetitiven) ELISA wird das zu testende Serum mit einem an eine Festphase gebundenes Antigen inkubiert. Die im Serum enthaltenen Antikörper binden an das Antigen (Abb. 13). Zum Antigen-Antikörper-Komplex wird Enzym-markiertes Antiglobulin gegeben. Nach Zusatz des Enzymsubstrats wird aus der Extinktionsänderung die Antikörperkonzentration bestimmt. Alle drei ELISA-Systeme benutzen als Konjugat Protein G, ein Zellwandrezeptor, der an das IgG der meisten Säuger inklusive der meisten Wildwiederkäuer bindet (AKERSTRÖM et al., 1985). Sie sind daher für die speziesübergreifende Diagnostik von Wildwiederkäuern geeignet (GOWARD et al., 1990; KRAMSKY et al., 2003).

#### 3.4.4.3.1 ELISA für *C. psittaci* assoziierte Antikörper

Für die Detektion von Antikörpern gegen *C. psittaci* wurde der CHEKIT®-*Chlamydia* (Firma IDEXX GmbH, Ludwigsburg) verwendet. Die Platten sind mit inaktiviertem Ganzzellantigen von Chlamydien beschichtet. Gebundene Antikörper werden mit einem monoklonalen, PO-markierten Anti-Ruminant-IgG-Konjugat nachgewiesen. Die Testdurchführung und Auswertung erfolgte laut Herstellerangaben. Die Seren sowie die Positiv- und Negativkontrollen wurden 1:400 mit gebrauchsfertiger Wasch- und Verdünnungslösung vorverdünnt. Anschließend wurden je 100 µl in jedes Well der ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wurde luftdicht verschlossen 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl Anti-Ruminant-IgG-PO-Konjugat in jedes Well zugegeben und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl TMB-Substrat zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde im ELISA Reader (Sunrise, Firma Tecan) die OD bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Aus dem Extinktionswert der Probe und dem Extinktionsmittelwert der Negativkontrollen wurde die prozentuale Hemmung wie folgt berechnet:

$$\text{OD\% (Probe)} = \frac{\text{OD (Probe)} - \text{OD Negativkontrolle} \times 100}{\text{OD Positivkontrolle} - \text{OD Negativkontrolle}}$$

Entsprechend den Angaben des Herstellers lag der Grenzwert bei einer OD von 30%, d.h. eine Hemmung von <30% repräsentiert ein negatives, eine Hemmung zwischen 30 und 40% ein grenzwertiges, und eine Hemmung von >40% ein positives Resultat. Grenzwertige Proben wurden wiederholt getestet. Für die Gültigkeit des Tests durfte die OD der Negativkontrolle maximal 0,5 und die OD der Positivkontrolle maximal 2,0 betragen. Zudem musste die Differenz zwischen Positiv- und Negativkontrolle mindestens 0,3 betragen.

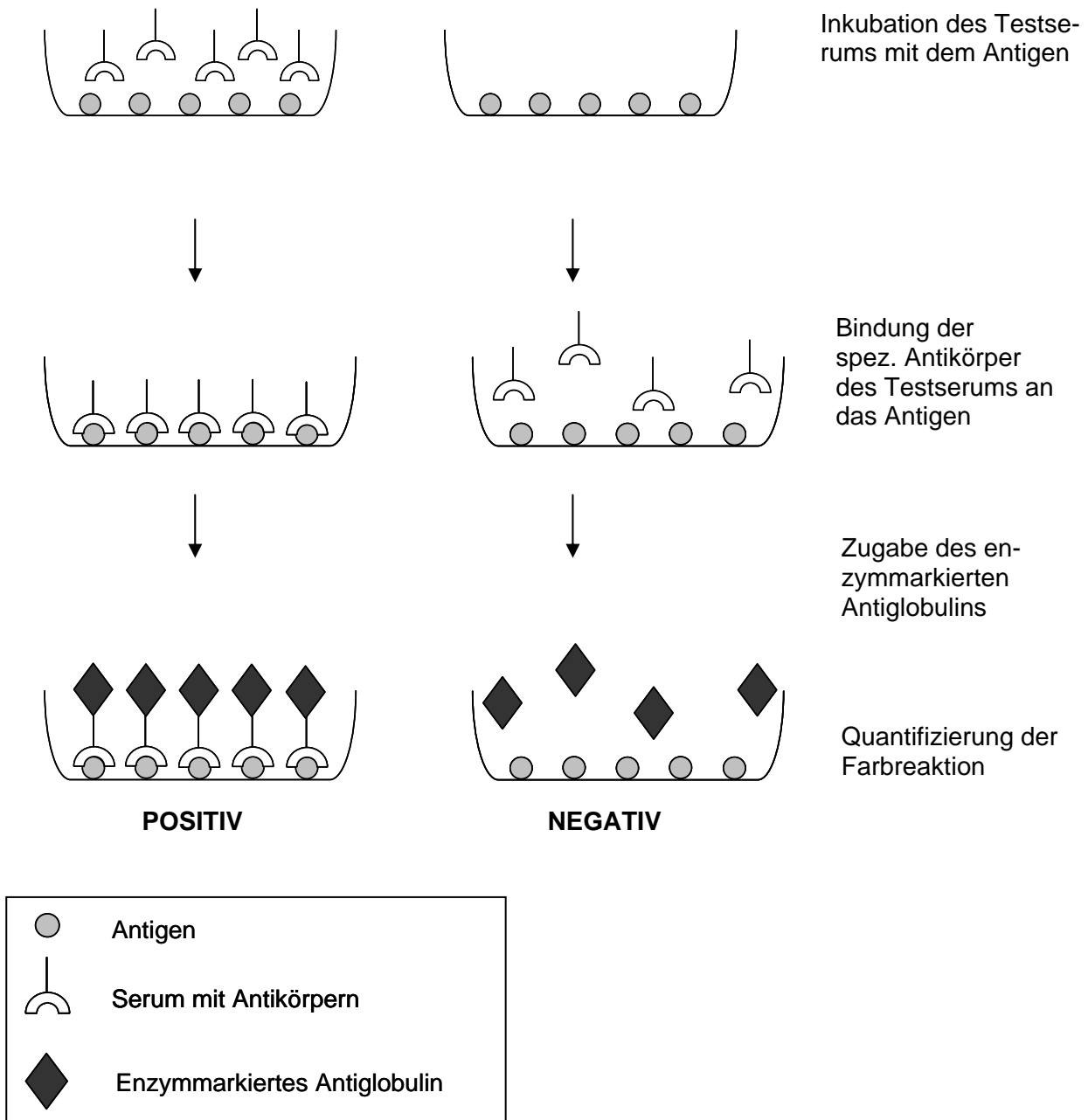


Abb. 13: Prinzip des indirekten ELISA zum Nachweis von *C. psittaci*, *C. burnetii* und *M.pt.* assoziierten Antikörpern.

### 3.4.4.3.2 ELISA für *C. burnetii* assoziierte Antikörper

Für die Detektion von Antikörpern gegen *C. burnetii* wurde der CHEKIT-Q-Fever® (Firma IDEXX GmbH, Ludwigsburg) verwendet. Die Platten sind mit inaktiviertem *C. burnetii*-LPS Antigen Phase 1 und 2 beschichtet, an das die im Serum enthaltenen spezifischen Phase 1 und Phase 2 Antikörper binden können. Diese werden mit Hilfe eines monoklonalen Anti-Ruminant-IgG-PO-Konjugat nachgewiesen.

Die Testdurchführung und Auswertung erfolgte laut Herstellerangaben. Die Seren sowie die Positiv- und Negativkontrollen wurden 1:400 mit gebrauchsfertiger Wasch- und Verdünnungslösung verdünnt. Die ELISA-Platte wurde mit 100 µl pro Well beschickt und in einer feuchten Kammer 60 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl Anti-Ruminant-IgG-PO-Konjugat in jedes Well zugegeben und 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl Chromogen zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde mittels eines ELISA Readers (Sunrise, Firma Tecan) die OD bei 450 nm gemessen. Die Probenwerte wurden mit derselben Formel wie für *C. psittaci* beschrieben berechnet:

$$\text{OD\% (Probe)} = \frac{\text{OD (Probe)} - \text{OD (Neg)}}{\text{OD (Pos)} - \text{OD (Neg)}} \times 100$$

Entsprechend dem ELISA für *C. psittaci* lag auch hier der „cut off“ bei 30%, d.h. Probenwerte <30% wurden als negativ, 30-40% als grenzwertig und >40% als positiv gewertet.

### 3.4.4.3.3 ELISA für *M.pt.* assoziierte Antikörper

Für die Detektion von Antikörpern gegen *M.pt.* wurde das HerdChek® *M.pt.* Antikörper-Testkit der Firma IDEXX GmbH, Ludwigsburg, verwendet. Um die kreuzreagierenden Antikörper gegen atypische Mykobakterien zu entfernen, wurden die Proben mit *M. phlei*-Extrakt vorinkubiert und danach auf die mit *M.pt.*-Antigen beschichteten Mikrotiterplatten gebracht. Die gebundenen Ak wurden mit einem Anti-Ruminant-IgG-PO-Konjugat nachgewiesen.

Die Testdurchführung und Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Vorinkubation mit *M. phlei* wurden 135 µl der Absorbenslösung mit je 15 µl Serum (bzw. Positivkontrolle und Negativkontrolle) 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der vorinkubierten Proben und Kontrollen in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde mit einer selbstklebenden Folie versiegelt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal gewaschen und 100 µl der Konjugatlösung in jedes Well pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der fünfmalige Waschvorgang wiederholt und je 100 µl Substrat zugegeben. Die Platte wurde 10 min bei

Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Substratumsatz durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in derselben Reihenfolge wie die Substratzugabe erfolgte, beendet. Die Extinktionswerte wurden anschließend im ELISA Reader (Sunrise, Firma Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Das Ergebnis wurde berechnet, indem der OD-Wert der Positivkontrolle (Pos) und der OD-Wert der Probe um den OD-Wert der Negativkontrolle (Neg) korrigiert wurden. Anschließend wurde das Verhältnis der Probe zur Positivkontrolle berechnet:

$$\text{OD\% (Probe)} = \frac{\text{OD (Probe)} - \text{OD (Neg)}}{\text{OD (Pos)} - \text{OD (Neg)}}$$

Proben von Rindern und Wildwiederkäuern mit einem Probe/Pos-Verhältnis von  $\leq 0,15$  wurden als negativ, mit einem Verhältnis von  $0,15-0,3$  als fraglich und von  $\geq 0,3$  als positiv bewertet. Proben von Schafen und Ziegen wurden bei einem Verhältnis von  $< 0,3$  als negativ, von  $0,3-0,4$  als fraglich und  $\geq 0,4$  als positiv bewertet. Fragliche Proben wurden wiederholt getestet. Für die Gültigkeit des Tests musste die Differenz zwischen dem Mittelwert der Positiv- und Negativkontrolle  $\geq 0,15$  sein. Zudem musste die Extinktion der Negativkontrolle  $\leq 0,2$  sein.

### **3.4 Angewandte statistische Verfahren**

Bei der statistischen Auswertung der serologischen Ergebnisse wurden nur die als „positiv“ oder „negativ“ bewerteten Proben berücksichtigt. Die als „fraglich“ Bewerteten wurden ausgeschlossen.

#### **3.5.1 Einteilung der epidemiologischen Rahmendaten**

Um die Expositionswahrscheinlichkeit (Seroprävalenz) zu untersuchen, sind für jedes Tier folgende Rahmendaten erfasst worden:

- Herkunft des Tieres (Zoologische Einrichtung)
- Haltungsform
- Gehegegröße
- zur Verfügung stehende Fläche pro Tier (Kehrwert der Populationsdichte)
- Taxonomische Stellung (Familie, Unterfamilie, Spezies)
- Alter
- Geschlecht
- Entnahmedatum der Probe (Jahreszeit, Jahr)

Für die statistische Analyse wurden die epidemiologischen Rahmendaten (Einflussgrößen) durch Einteilung in verschiedene Kategorien von ordinalen in kategoriale Daten umgewandelt (Tab. 7).

**Tab. 7: Epidemiologische Rahmendaten und ihre Einteilung in Kategorien**

<b>Einflussgröße</b>	<b>Kategorien</b>
<b>Haltungsform</b>	Einzelarhaltung
	Gemeinschaftshaltung mindestens 2 Spezies aus derselben taxonomischen Familie
	Gemeinschaftshaltung mindestens 2 Spezies aus unterschiedlichen Familien
	Streichelzoo
<b>Gehegegröße</b>	< 500 m <sup>2</sup>
	501 - 1000 m <sup>2</sup>
	1001 - 2000 m <sup>2</sup>
	2001 - 4000 m <sup>2</sup>
	> 4000 m <sup>2</sup>
<b>Kehrwert der Populationsdichte</b>	< 45 m <sup>2</sup> / Tier
	46 - 70 m <sup>2</sup> / Tier
	71 - 100 m <sup>2</sup> / Tier
	101 - 200 m <sup>2</sup> / Tier
	>200 m <sup>2</sup> / Tier
<b>Alter des Tieres</b>	< 6 Monate
	≥ 6 Monate < 24 Monate
	≥ 24 Monate
<b>Jahreszeit</b>	Winter (Dezember-Februar)
	Frühling (März-Mai)
	Sommer (Juni-August)
	Herbst (September-November)



### 3.5.2 Statistische Analyse der epidemiologischen Rahmendaten

Die statistische Analyse ist aufgrund der Eigenschaften der Stichproben eine explorative Analyse. Diese kann Hinweise auf bestimmte Auffälligkeiten in der Seroprävalenz für bestimmte Segmente der Gesamtpopulation der Zooungulaten geben, die sich auf demographische, taxonomische, haltungsbedingte oder probennahmebedingte Aspekte beziehen. Für die Beurteilung des Einflusses möglicher Faktoren auf die Expositionswahrscheinlichkeit gegen bestimmte Infektionserreger (Seroprävalenz) wurde folgendermaßen vorgegangen. Zunächst wurden zur groben Übersicht alle Einflussfaktoren gleichzeitig einbezogen. Anschließend wurden mittels Chi-Quadrat-Test die Rahmendaten einzeln auf ihren Einfluss auf die Seroprävalenz des jeweiligen Erregers überprüft. Als „signifikant“ wurde das Ergebnis dann gewertet, wenn  $p \leq 0,05$  war. Um stark vom Erwartungswert abweichende Daten in Kreuzwerttabellen zu identifizieren, wurden adjustierte Residuen (a.r.) verwendet (BARTLETT und COX, 1977). Dabei wird eine normierte (standardnormalverteilte) Differenz zwischen Beobachtungswert und Erwartungswert gebildet. Der Erwartungswert selbst wird unter der Unabhängigkeitshypothese der beobachteten Stichprobe geschätzt. Ein a.r. wurde als auffällig gewertet, wenn sein Betrag 1,96 überstieg. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem PC-Programm SPSS 15 (SPSS Inc. für Windows, Chicago, USA). Bei kleinen Stichproben wurde der exakte p-Wert mit Hilfe des Statistikprogrammes StatXact 8 (Cytel Inc., USA) berechnet.

Als Maß der Beteiligung der Erreger an Zweifachinfektionen wurde anhand der folgenden Formel der Tanimoto-Koeffizient berechnet (LAUTSCH und LIENERT, 1993):

$$T = \frac{a}{(a+b+c)}$$

Dabei ist a die Anzahl der Tiere, die Antikörper gegen zwei bestimmte Erreger gleichzeitig hatten und b resp. c die Anzahl der Tiere, die nur Antikörper gegen den einen oder den anderen Erreger aufwiesen. Die Ergebnisse der statistischen Analyse werden im Kap. 5.3 diskutiert.