

## 4 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

### 4.1 Molekularbiologische Untersuchungen

#### 4.1.1 Fortführung der epidemiologischen Untersuchung

Im Jahr 2004 wurden 22 Proben von Hühnern sowie eine Probe von Puten und 2005 zwölf Proben von Hühnern sowie eine Probe von Puten mit der Verdachtsdiagnose „Geflügelpocken“ aus Deutschland an das Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin eingesandt. Die Proben wurden mittels PCR mit den Primern FP1 und FP2 (Lee und Lee, 1997) auf FPV-DNA untersucht. Bei zehn Proben aus dem Jahr 2004 und zwei der Proben aus dem Jahr 2005 bestätigte sich der Verdacht, bei den restlichen Proben konnte keine FPV-DNA nachgewiesen werden. Sieben der positiven Proben stammten von Legehennen aus verschiedenen Herden eines Betriebes, zwei im Abstand von drei Monaten aus derselben Herde. In drei Fällen trat die Hautform auf, in vier Fällen die Mischform und in fünf Fällen die Schleimhautform (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Am Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin mittels PCR diagnostizierte Pockenerkrankungen in den Jahren 2004 und 2005**

Nummer	Nutzungsrichtung	Verlaufsform	Monat
<b>2004</b>			
GB 63/04	Legehennen	Mischform	Januar
GB 89/04	Legehennen	Hautform	Januar
GB 118/04	Legehennen	Schleimhautform	Februar
GB 199/04	Legehennen	Hautform	Februar
GB 285/04	Legehennen	Mischform	März
GB 367/04	Legehennen	Mischform	April
GB 407/04 GB 763/04	Legehennen	Schleimhautform	April/ Juli
GB 762/04	Legehennen	Schleimhautform	Juli
GB L8/04	Legenhennen	Hautform	November
<b>2005</b>			
GB 417/05	Legehennen	Mischform	April
GB 695/05	Legehennen	Schleimhautform	Mai

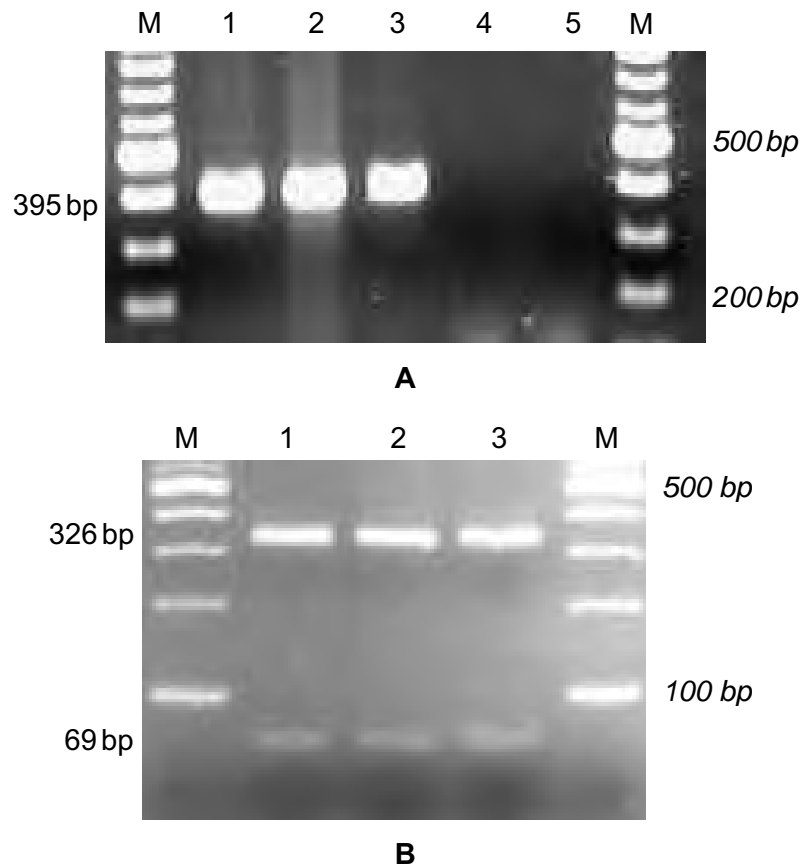
#### **4.1.2 Etablierung einer Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis von Pocken- und REV-spezifischen Sequenzen**

Um das gleichzeitige Vorliegen von FPV- und proviralen REV-Sequenzen in einer PCR zu detektieren, wurde eine Multiplex-PCR etabliert. Zielsequenzen waren das 4b-Core-Protein des FPV, sowie die LTR und die env-, gag- und pol- Sequenzen des REV. Die Primerpaare zum Nachweis des FPV, der LTR und des env-Genes wurden der Literatur entnommen. Die Primer zum Nachweis der gag- und pol-Gene wurden selbst entwickelt. Zunächst wurde ihre Spezifität einzeln überprüft.

##### 4.1.2.1 Überprüfung der Spezifität der Primerpaare zum Nachweis des gag- bzw. des pol-Genes

Aus der proviralen DNA des REV-Stammes CSV sowie der beiden FPV-Feldisolate GB 570/01 und GB 1016/02, in denen mittels PCR mit dem Primerpaar E3/4 REV-spezifische DNA nachgewiesen worden war, wurde je eine PCR mit den Primerpaaren gag C/D bzw. pol O/X durchgeführt. Die PCR-Produkte hatten die erwartete Größe von 395bp (Abbildung 5 A) bzw. 767bp (Abbildung 6 A). Die PCR aus dem FPV-Stamm HP 1, in dem lediglich Reste der REV-LTR integriert sind (Laidlaw und Skinner, 2004), verlief mit beiden Primerpaaren negativ.

Bei der Restriktionsenzymanalyse (REA) zur Absicherung der Spezifität des gag-Amplikons mit *KpnI* traten die erwarteten zwei Fragmente von 69bp und 326bp auf (Abbildung 5 B). Bei der REA der pol-Amplikons mit *EcoRV* hatten die Fragmente die erwartete Größe von 187bp und 580bp (Abbildung 6 B).

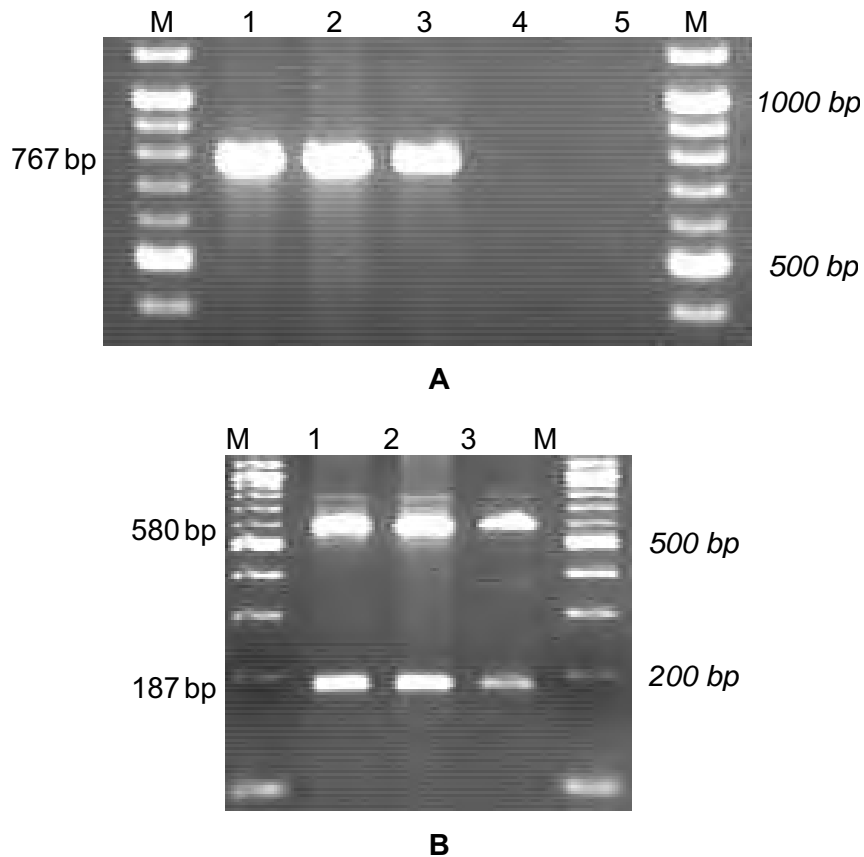


**Abbildung 5:**

**A:** Überprüfung der Spezifität des Primerpaares gag C/D; M: 100 bp-Marker, Spur 1: GB 570/01, Spur 2: GB 1016/02, Spur 3: CSV, Spur 4: HP 1, Spur 5: Negativkontrolle;

**B:** REA der durch die Primer gag C/D amplifizierten PCR-Produkte mit Kpn I; M: 100 bp-Marker, Spur 1: GB 570/01, Spur 2: GB 1016/02, Spur 3: CSV

Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.



**Abbildung 6:**

**A:** Überprüfung der Spezifität des Primerpaares *pol O/X*; M: 100 bp–Marker; Spur 1: GB 570/01, Spur 2: GB 1016/02, Spur 3: CSV, Spur 4: HP 1, Spur 5: Negativkontrolle;

**B:** REA der durch die Primer *pol O/X* amplifizierten PCR–Produkte mit *EcoR V*; M: 100 bp–Marker, Spur 1: GB 570/01, Spur 2: GB 1016/02, Spur 3: CSV

Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.

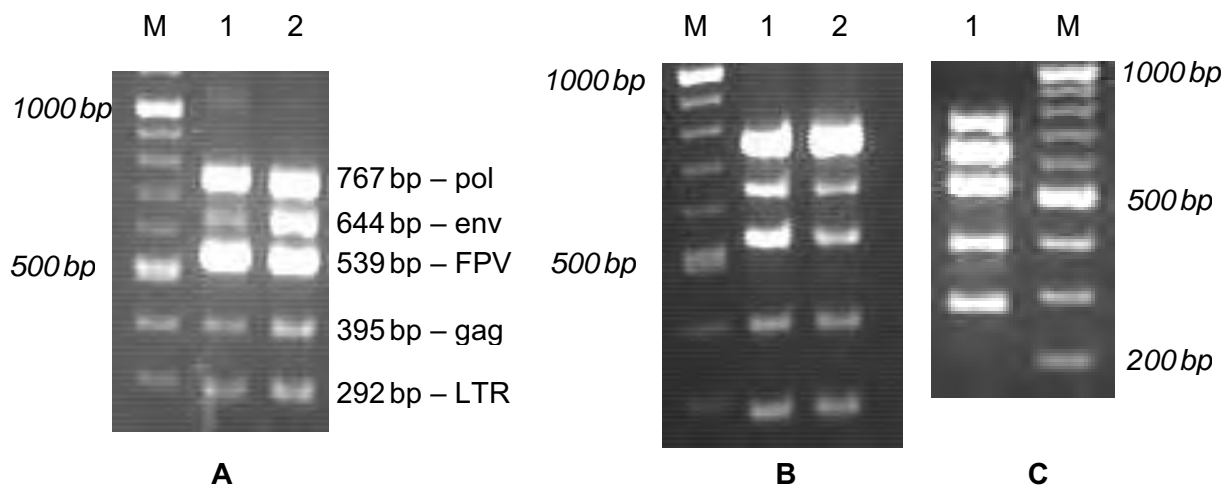
#### 4.1.2.2 Austestung verschiedener Primermengen

Um eine möglichst gute Vervielfältigung aller Amplikons zu erreichen, wurden verschiedene Kombinationen von Primermengen mit der DNA des FPV–Feldisolates GB 285/05 getestet. Zunächst wurden von jedem Primer 6,25 pmol eingesetzt. Danach wurde, da das FPV–Amplikon sehr deutlich war (Abbildung 7 A), zunächst die Menge der anderen Primer auf 12,5 pmol verdoppelt und die Menge der Primer FP1 und FPB auf 3,125 pmol bzw. 1,56 pmol gesenkt (Abbildung 7 A und B). Da das FPV–Amplikon bei 1,56 pmol sehr schwach war (Abbildung 7 B), wurde in den weiteren Untersuchungen mit 3,125 pmol gearbeitet. Im letzten Schritt wurde die Menge der Primer *pol O* und *pol X* wegen des sehr deutlichen *pol*–Amplikons wieder auf 6,25 pmol halbiert und die Menge des Primerpaares L1 und L2 wegen des schwachen LTR–Amplikons auf 25 pmol erhöht (Abbildung 7 C). Diese letzte Kombination aus Primermengen schien am geeignetsten und

wurde für die weiteren Untersuchungen beibehalten. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die getesteten Kombinationen.

**Tabelle 12: Getestete Primermengen**

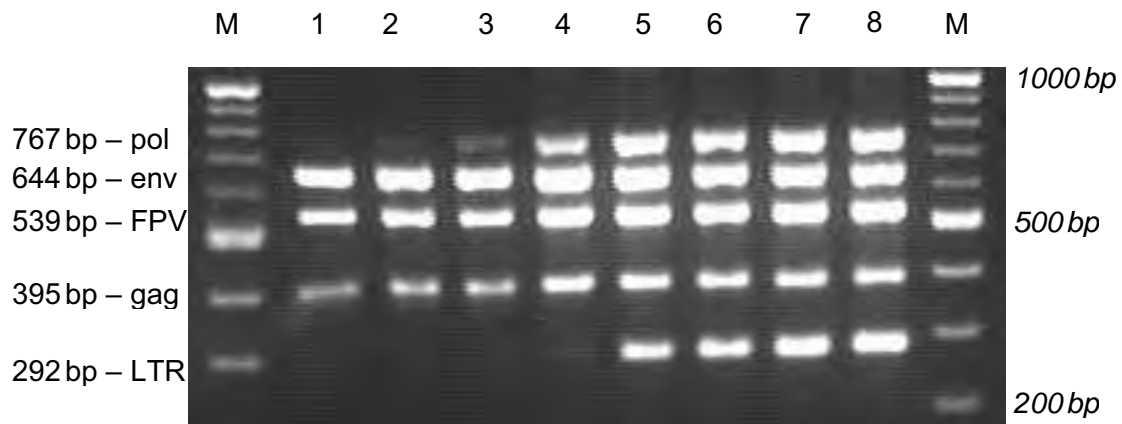
Versuch	Eingesetzte Menge in pmol je Primer					Abgebildet in	
	FP 1/B	PoI O/X	E 3/4	Gag C/D	L 1/2	Abbildung	Spur
1	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	Abbildung 7 A	1
2	6,25	12,5	12,5	12,5	12,5	Abbildung 7 A	2
3	3,125	12,5	12,5	12,5	12,5	Abbildung 7 B	1
4	1,56	12,5	12,5	12,5	12,5	Abbildung 7 B	2
5	3,125	6,25	12,5	12,5	25	Abbildung 7 C	1



**Abbildung 7: Austestung verschiedener Primermengen; M: 100 bp-Marker**  
Die eingesetzten Primermengen, die zur Amplifizierung der auf die Spuren aufgetragenen PCR-Produkte eingesetzt wurden, sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.

#### 4.1.2.3 Optimierung der Anlagerungstemperatur

Um eine geeignete Anlagerungstemperatur zu ermitteln, wurden mit der DNA des FPV-Feldisolates GB 285/05 in einem Gradientenlauf verschiedene Anlagerungstemperaturen getestet. Die Ergebnisse mit den von dem Cycler vorgegebenen Temperaturen (Abbildung 8) zeigten, daß eine angemessene Amplifizierung aller fünf DNA-Sequenzen bei 58,4 °C und niedrigeren Temperaturen erfolgte. Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Anlagerungstemperatur von 57 °C gewählt, um eine möglichst hohe Spezifität zu gewährleisten.

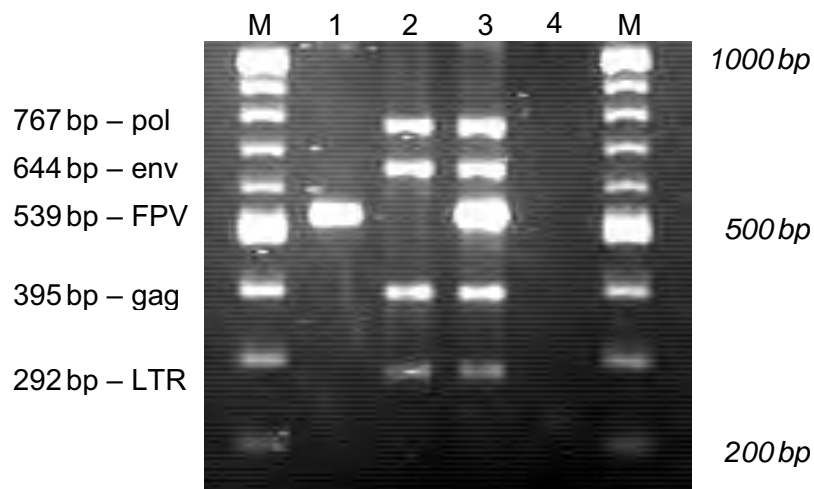


**Abbildung 8: Optimierung der Anlagerungstemperatur der Multiplex-PCR; M: 100 bp-Marker, Spur 1: 62°C, Spur 2: 61,5°C, Spur 3: 60,3°C, Spur 4: 58,4°C, Spur 5: 55,9°C, Spur 6: 54,1°C, Spur 7: 52,8°C, Spur 8: 52°C. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.**

#### 4.1.2.4 Überprüfung der Spezifität der Multiplex-PCR

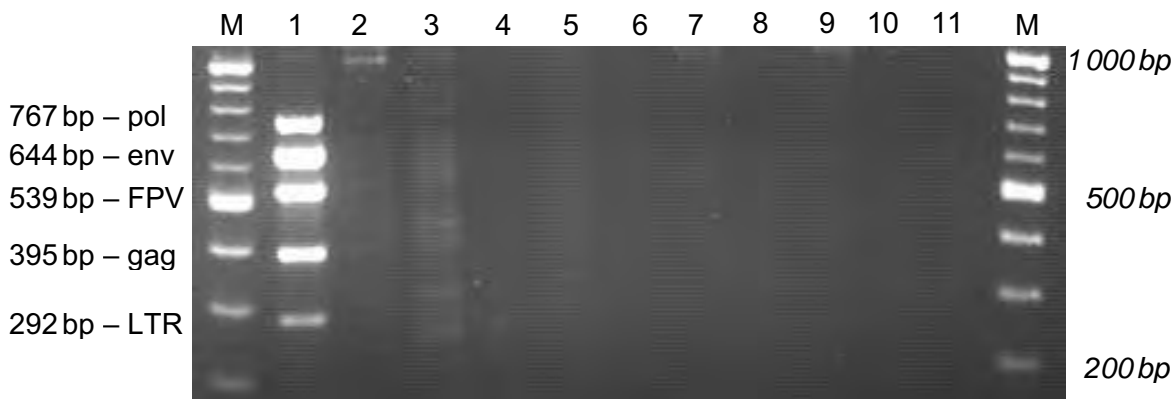
Zur Überprüfung der Spezifität wurde die Multiplex-PCR mit DNA des FPV-Stamms HP 1, des REV-Stamms CSV sowie einem Gemisch der DNA bzw. proviralen DNA beider Viren durchgeführt. Zur Herstellung des Gemisches waren gleiche Volumina beider DNAs ohne Berücksichtigung des DNA-Gehaltes gemischt worden.

Bei Durchführung der Multiplex-PCR mit dem FPV-Stamm HP 1 war nur die FPV-spezifische Bande bei 539 bp nachweisbar, während mit dem REV-Stamm CSV nur die REV-spezifischen Amplikons mit 767 bp (pol), 644 bp (env), 395 bp (gag) und 292 bp (LTR) auftraten. Bei der Untersuchung des Gemisches wurden alle fünf Amplikons detektiert (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Multiplex-PCR; M: 100 bp-Marker, Spur 1: HP 1, Spur 2: REV, Spur 3: REV + HP 1, Spur 4: Negativkontrolle. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.**

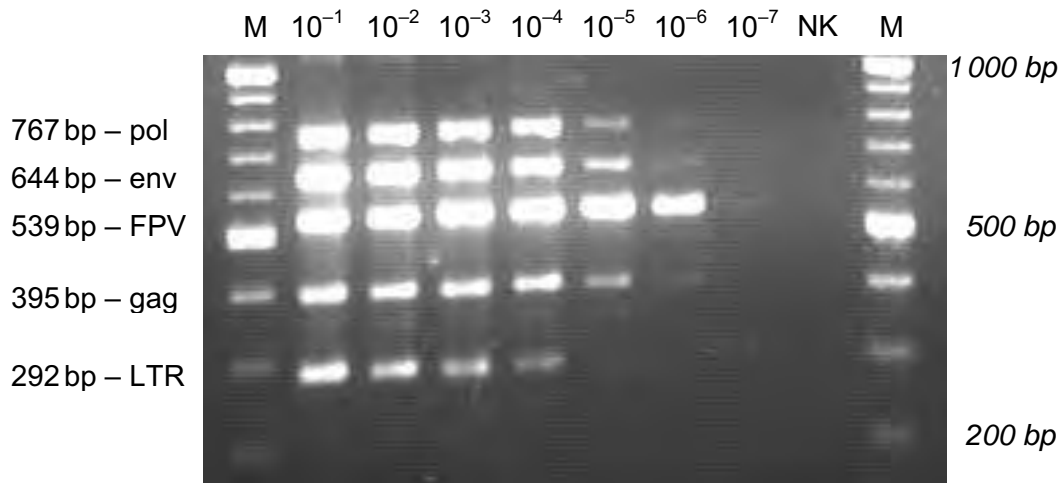
Die Multiplex-PCR mit der proviralen DNA anderer Retroviren (Aviäres Leukose-Virus, Rous-Sarkoma-Virus) sowie der DNA anderer Pathogene, die beim Geflügel im Respirationstrakt bzw. auf der Haut vorkommen können (Gallides Herpesvirus 1 – Virus der infektiösen Laryngotracheitis, Ornithobacterium rhinotracheale, Mycoplasma gallisepticum, Gallides Herpesvirus 2 – Virus der Marek'schen Krankheit, Escherichia coli), und mit nicht infizierten HEF und LMH verlief negativ (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Überprüfung der Spezifität der Multiplex-PCR; M: 100 bp-Marker, Spur 1: Positivkontrolle, Spur 2: aviäres Leukose-Virus, Spur 3: Rous-Sarkoma-Virus, Spur 4: Virus der infektiösen Laryngotracheitis, Spur 5: Ornithobacterium rhinotracheale, Spur 6: Mycoplasma gallisepticum, Spur 7: Gallides Herpesvirus 2, Spur 8: Escherichia coli, Spur 9: HEF, Spur 10: LMH, Spur 11: Negativkontrolle. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.**

#### 4.1.2.5 Vergleich der Sensitivität der einzelnen Primerpaare in der Multiplex-PCR

Aus DNA des FPV-Feldisolates GB 285/05 wurde eine Verdünnungsreihe in Zehner-Schritten bis zu einer Verdünnung von  $1:10^7$  angelegt, und die Multiplex-PCR mit  $5\ \mu\text{l}$  jeder Verdünnungsstufe durchgeführt. Bis zu einer Verdünnung von  $1:10^4$  wurden alle fünf PCR-Produkte amplifiziert. Ab einer Verdünnung von  $1:10^5$  und  $1:10^6$  war das LTR-Amplikon auf dem Gel nicht mehr, und die gag-, env- und pol Produkte nur schwach sichtbar. Bei der Verdünnung von  $1:10^7$  wurde lediglich das FPV-Produkt zur Sichtbarmachung ausreichend amplifiziert (Abbildung 11). Innerhalb des Multiplex-PCR-Systems hatte die LTR-PCR die niedrigste Sensitivität, so daß bei einer zu geringen DNA-Menge die LTR-PCR negativ verlief. Bei weniger DNA waren auch die anderen REV-spezifischen Amplikons nicht nachweisbar. Die FPV-PCR besaß die höchste Sensitivität.

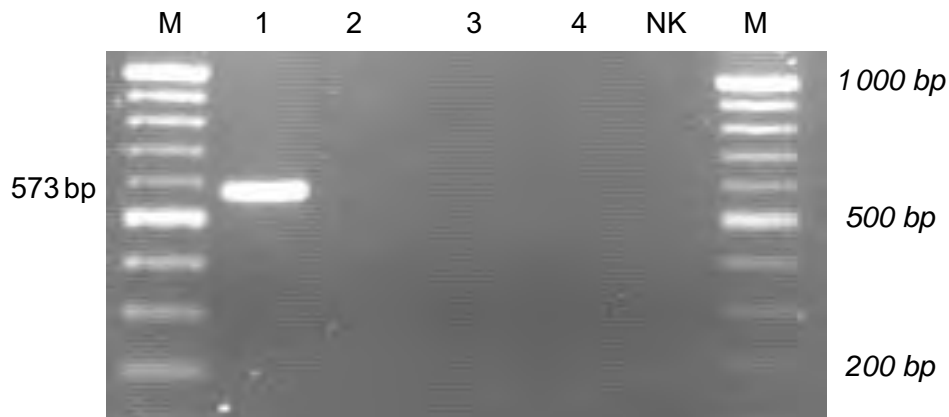


**Abbildung 11: Überprüfung der Sensitivität der Multiplex-PCR; M: 100 bp-Marker,  $10^{-1} - 10^{-7}$ : die jeweilige Verdünnungsstufe, NK: Negativkontrolle. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.**

#### **4.1.3 Etablierung einer chimären PCR zum Nachweis der Integration von REV-spezifischen Nukleotidsequenzen in FPV-DNA**

Um die Möglichkeit einer zufälligen Co-Infektion auszuschließen und die Integration des fast vollständigen REV-Provirus (fvRP) in das Genom des FPV nachzuweisen, wurde eine PCR mit dem FPV-spezifischen Primer R1 und dem REV-spezifischen Primer L2 angewendet. Zur Überprüfung der Spezifität wurde die PCR aus der DNA des FPV-Feldisolates GB 570/01, in dem mittels PCR mit den Primern GagC und GagD bzw. PolO und PolX REV-Sequenzen nachgewiesen worden waren, aus der DNA des Stammes HP 1, der kein fvRP enthält, aus proviraler CSV-DNA sowie aus einem Gemisch der beiden letztgenannten DNAs durchgeführt. Das erwartete Amplikon von 573 bp wurde nur in der DNA des Feldisolates, jedoch nicht des FPV-Stammes HP 1, des CSV oder dem DNA-Gemisch nachgewiesen (Abbildung 12). Somit wies die chimäre PCR nur in das Pockengenom integrierte REV-Sequenzen nach.





**Abbildung 12: Überprüfung der Spezifität der chimären PCR; M: 100 bp–Marker, Spur 1: GB 570/01; Spur 2: HP 1; Spur 3: CSV; Spur 4: HP 1 + CSV, NK: Negativkontrolle. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.**

#### 4.1.4 Untersuchung von FPV–DNA aus Feldausbrüchen auf das Vorliegen REV–spezifischer Nukleotidsequenzen

Um festzustellen, wie weit das integrierte fvRP in Geflügelpockenviren in Deutschland verbreitet ist, wurde DNA, die aus pockentypischen Läsionen von Feldausbrüchen in den Jahren 2001 bis 2005 isoliert worden war und in der bereits FPV–DNA nachgewiesen worden war, sowie DNA des in Deutschland als Vakzine zugelassenen Stammes HP B untersucht. Die Untersuchung erfolgte mittels der Multiplex–PCR und der chimären PCR.

Die Herkunft der untersuchten DNA und die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgelistet. Bei 34 von 42 untersuchten DNAs aus Feldproben konnten in der Multiplex–PCR neben dem FPV–Amplikon auch alle vier REV–Amplikons nachgewiesen werden. Dies war unabhängig von der Tierart (Huhn oder Pute), der Nutzungsrichtung (Legehennen, Mast–Elterntiere, Mastputen, Puten–Elterntiere) und der Krankheitsform (Abbildung 13).

Bei einer DNA (Ifd. Nr. 7) gelang der Nachweis des pol–Amplikons in der Multiplex–PCR nicht, bei zwei DNAs (Ifd. Nr. 37 und 39) war der Nachweis des LTR–Amplikons negativ, und bei drei weiteren DNAs (Ifd. Nr. 25, 38 und 42) konnten beide Amplikons in der Multiplex–PCR nicht nachgewiesen werden. Daher wurde untersucht, ob sich die Sequenzbereiche mittels Uniplex–PCR nur mit dem jeweiligen Primerpaar nachweisen ließen. In allen sechs Fällen gelang dieser Nachweis.

Aus der DNA GB 93/03 (Ifd. Nr. 23) wurden in der Multiplex–PCR nur das FPV– und das gag–Amplikon nachgewiesen. Die pol–, env– und LTR–Amplikons ließen sich auch mittels Uniplex–PCR nicht amplifizieren. Jedoch verlief eine an die Uniplex–PCR mit dem Primerpaar E3/4 angeschlossene nested PCR (nPCR) mit dem Primerpaar E5/6 zum Nachweis des env–Genes positiv.

Aus der Feld-DNA GB L8/04 (Ifd. Nr. 40) war in der Multiplex-PCR nur die FPV-spezifische Sequenz nachweisbar. Die gag-, pol-, env- und LTR-Amplikons ließen sich auch mittels Uniplex-PCR mit dem jeweiligen Primerpaar nicht vervielfältigen. Jedoch verlief die nPCR mit dem Primerpaar E 5 und E 6 zum Nachweis des env-Genes positiv.

In dem Impfstamm HP B konnten mittels der Multiplex-PCR keine REV-Sequenzen nachgewiesen werden (Tabelle 13, Abbildung 13).

Mit der chimären PCR ließ sich bei allen untersuchten Feld-DNAs, mit Ausnahme von GB 93/03 (Ifd. Nr. 23) und GB L8/04 (Ifd. Nr. 40), zeigen, daß die REV-Sequenzen integriert vorlagen (Tabelle 13, Abbildung 14).

**Tabelle 13: Mittels Multiplex-PCR untersuchte FPV-Isolate**

Ifd. Nr.	Einsendung	Nutzungsrichtung	Verlaufsform <sup>1</sup>	Nachweis von					Chimäre PCR
				FPV	gag	pol	env	LTR	
–	HP B	Impfstamm		M <sup>2</sup>	–	–	–	–	neg <sup>3</sup>
1	GB 48/01	Broiler-Elterntiere	Schleimhautform	M	M	M	M	M	pos
2	GB 79/01	Broiler-Elterntiere	Schleimhautform	M	M	M	M	M	pos
3	GB 320/01	Legehennen	Schleimhautform	M	M	M	M	M	pos
4	GB 439/01	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
5	GB 570/01	Legehennen	Mischform	M	M	M	M	M	pos
6	GB 672/01	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
7	GB 836/01	Unbekannt	Schleimhautform	M	M	U	M	M	pos
8	GB 1153/01	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
9	GB 246/02	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
10	GB 254/02	Puten-Elterntiere	Hautform	M	M	M	M	M	pos
11	GB 869/02	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
12	GB 989/02	unbekannt	Hautform	M	M	M	M	M	pos
13	GB 1016/02	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
14	GB 1166/02	Mastputen	Mischform	M	M	M	M	M	pos
15	GB 1187/02	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
16	GB 1207/02	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
17	GB 1212/02	Junghennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
18	GB 1314/02	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
19	GB 1327/02	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
20	GB 1339/02	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
21	GB 1340/02	Legehennen	Mischform	M	M	M	M	M	pos

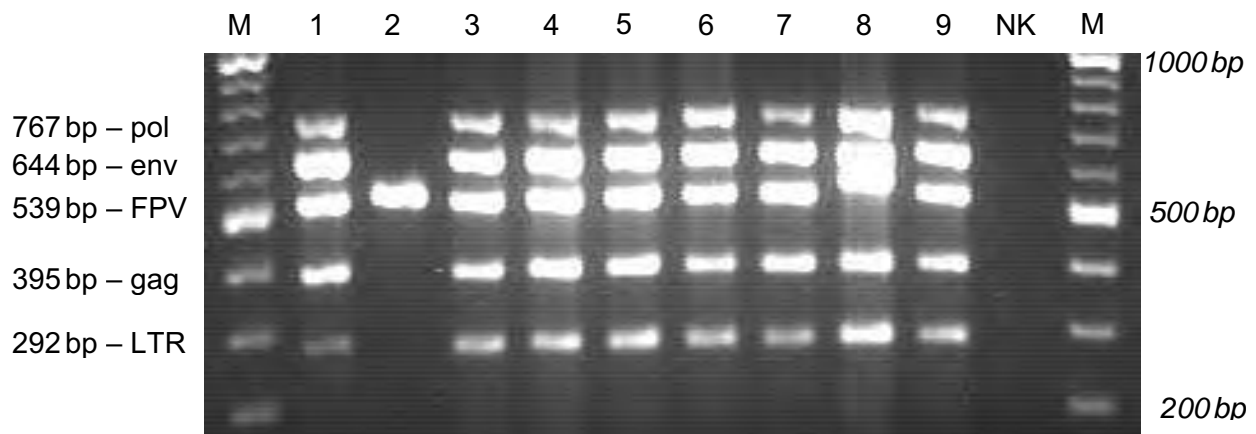
## Fortsetzung Tabelle 13

Ifd. Nr.	Einsendung	Nutzungsrichtung	Verlaufsform <sup>1</sup>	Nachweis von					Chimäre PCR
				FPV	gag	pol	env	LTR	
22	GB 1395/02	Legehennen	Mischform	M	M	M	M	M	pos
23	GB 93/03	Legehennen	Mischform	M	M	–	n	–	neg
24	GB 372/03	Mastputen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
25	GB 521/03	Legehennen	Schleimhautform	M	M	U	M	U	pos
26	GB 717/03	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
27	GB 740/03	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
28	GB 1033/03	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
29	GB 1300/03	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
30	GB 1301/03	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
31	GB 63/04	Legehennen	Mischform	M	M	M	M	M	pos
32	GB 89/04	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
33	GB 118/04	Legehennen	Schleimhautform	M	M	M	M	M	pos
34	GB 199/04	Legehennen	Hautform	M	M	M	M	M	pos
35	GB 285/04	Legehennen	Mischform	M	M	M	M	M	pos
36	GB 367/04	Legehennen	Mischform	M	M	M	M	M	pos
37	GB 407/04	Legehennen	Schleimhautform	M	M	M	M	U	pos
38	GB 762/04	Legehennen	Schleimhautform	M	M	U	M	U	pos
39	GB 763/04	Legehennen	Schleimhautform	M	M	M	M	U	pos
40	GB L8/04	Legehennen	Hautform	M	–	–	n	–	neg
41	GB 417/05	Legehennen	Mischform	M	M	M	M	M	pos
42	GB 695/05	Legehennen	Schleimhautform	M	M	U	M	U	pos

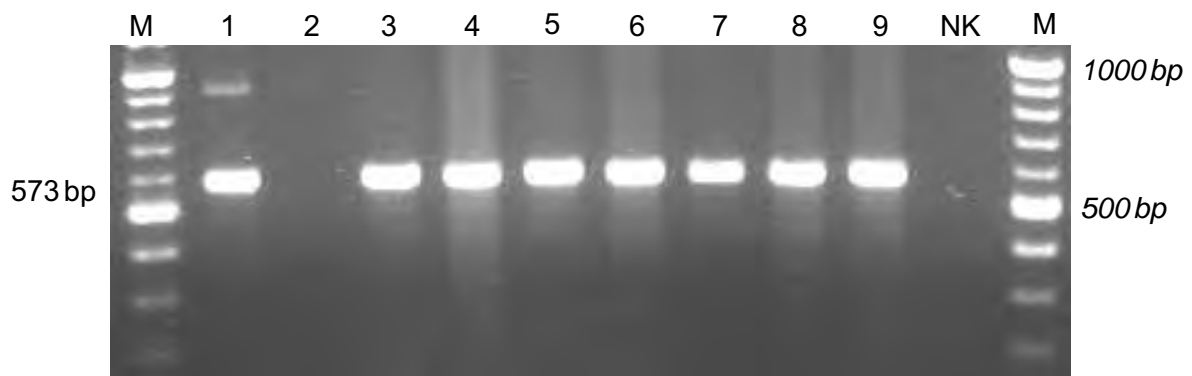
<sup>1</sup>Bei mangelhaftem Vorbericht wurde aus dem eingesandten Probenmaterial auf die Krankheitsform geschlossen.

<sup>2</sup>M: Nachweis in der Multiplex-PCR; U: Nachweis in der Uniplex-PCR; n: Nachweis mittels nPCR; –: Nachweis nicht möglich;

<sup>3</sup>neg: negativ; pos: positiv



**Abbildung 13: Untersuchung von Feldisolaten mittels der Multiplex-PCR zum Nachweis FPV- und REV-spezifischer Sequenzen; M: 100 bp-Marker; Spur 1: Positivkontrolle; Spur 2: HP B (Vakzinestamm); Spur 3: GB 320/01 (Nr. 3, Legehennen, Schleimhautform); Spur 4: GB 439/01 (Nr. 4, Legehennen, Hautform); Spur 5: GB 570/01 (Nr. 5, Legehennen, Mischform); Spur 6: GB 48/01 (Nr. 1, Broiler-Elterntiere, Schleimhautform); Spur 7: GB 1166/02 (Nr. 14, Mastputen, Mischform); Spur 8: GB 372/03 (Nr. 24, Mastputen, Hautform); Spur 9: GB 254/02 (Nr. 10, Puten-Elterntiere, Hautform); NK: Negativkontrolle. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.**



**Abbildung 14: Untersuchung von Feldisolaten mittels der chimären PCR zum Nachweis der Integration REV-spezifischer Sequenzen in das FPV-Genom; M: 100 bp-Marker; Spur 1: Positivkontrolle; Spur 2: HP B (Vakzinestamm); Spur 3: GB 320/01 (Nr. 3, Legehennen, Schleimhautform); Spur 4: GB 439/01 (Nr. 4, Legehennen, Hautform); Spur 5: GB 570/01 (Nr. 5, Legehennen, Mischform); Spur 6: GB 48/01 (Nr. 1, Broiler-Elterntiere, Schleimhautform); Spur 7: GB 1166/02 (Nr. 14, Mastputen, Mischform); Spur 8: GB 372/03 (Nr. 24, Mastputen, Hautform); Spur 9: GB 254/02 (Nr. 10, Puten-Elterntiere, Hautform); NK: Negativkontrolle. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.**

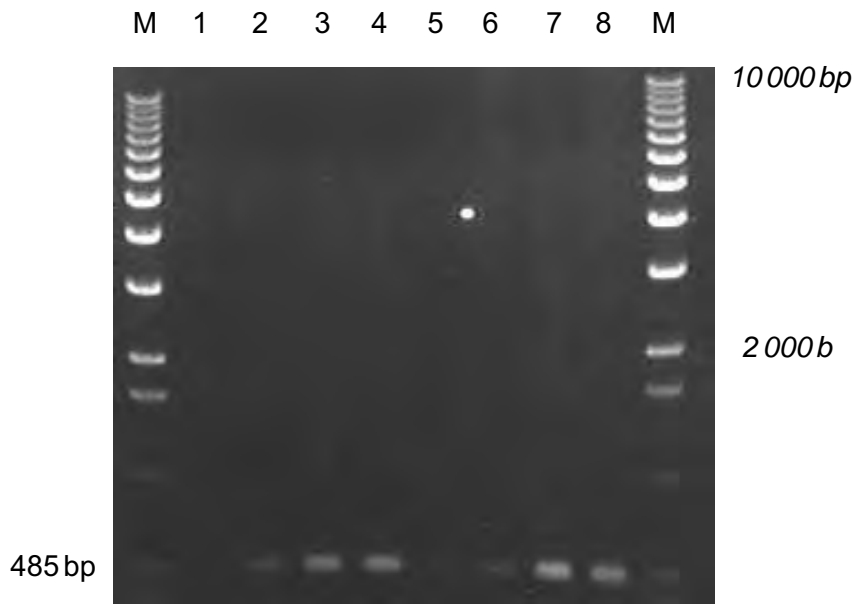
#### 4.1.5 Nachweis des fvRP mittels Long-Distance-PCR und REA

##### 4.1.5.1 Untersuchungen zum Nachweis des fvRP mit den Primern R 1 und R 2

Um das gesamte integrierte fvRP nachzuweisen und mittels REA weiter zu charakterisieren, wurde versucht, das fvRP mit einer Länge von errechneten 8 226 bp mittels Long-Distance-PCR mit den Primern R 1 und R 2 nachzuweisen. Zunächst sollten mit der DNA des Isolates GB 285/04 (Nr. 35) verschiedene Reaktionsbedingungen getestet werden. In der DNA des Isolates GB 285/04 waren alle vier REV-Sequenzbereiche und das chimäre PCR-Produkt, das mittels der Primer R1 und L2 amplifiziert worden war, nachgewiesen worden (Tabelle 13). Für den Versuch des Nachweises wurden Anlagerungstemperaturen von 57 °C und 54 °C, sowie verschiedene Primer- und Magnesiumkonzentrationen getestet (Tabelle 14). In keinem Fall gelang die Amplifikation des fvRP, bei einigen Reaktionsbedingungen gelang lediglich der Nachweis eines 485 bp langen PCR-Produktes, das die Integrationsstelle mit den Überresten der LTR umfasste (Abbildung 15).

**Tabelle 14: Getestete Kombinationen aus unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen sowie Primer- und Magnesiumkonzentration als Reaktionsbedingungen zur Amplifikation des fvRP mit den Primern R 1 und R 2**

Anlagerungs- temperatur	Primer- konzentration	Magnesium- konzentration	Spur in Abbildung 15
57 °C	Je 500 µM	1,5 mM	1
		2,5 mM	2
	Je 2000 µM	1,5 mM	3
		2,5 mM	4
54 °C	Je 500 µM	1,5 mM	5
		2,5 mM	6
	Je 2000 µM	1,5 mM	7
		2,5 mM	8



**Abbildung 15:** Versuch des Nachweises des fvRP mittels der Primer R1 und R2 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen; die Reaktionsbedingungen der auf die Spuren aufgetragenen PCR-Produkte sind in Tabelle 14 wiedergegeben. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.

#### 4.1.5.2 Versuch des Nachweises verschiedener chimärer PCR-Produkte

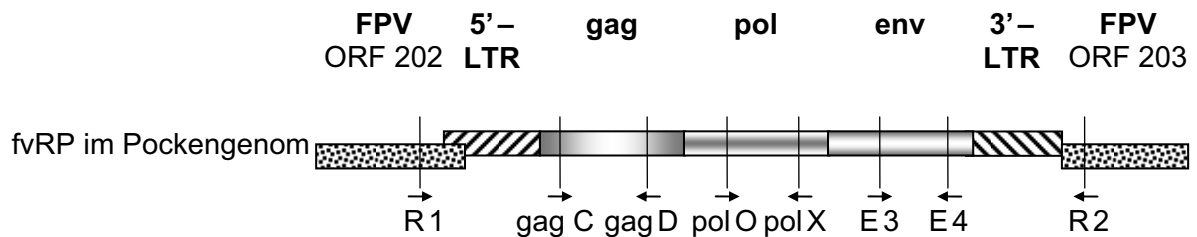
Um Hinweise auf die Ursache zu finden, warum der Nachweis des fvRP mit den Primern R1 und R2 nicht gelungen war, und um sich an dessen Amplifikation anzunähern, wurde versucht ausgehend von den Primern R1 und R2 chimäre PCR-Produkte nachzuweisen (Tabelle 15 und Tabelle 16). Die Position der Primer innerhalb des integrierten fvRP ist in Abbildung 16 wiedergegeben. Alle Amplikons, die nicht die 3'-LTR beinhalteten, konnten nachgewiesen werden. Ein die 3'-LTR umfassendes Amplikon konnte nur mittels der Primer R2 und E3 vervielfältigt werden.

**Tabelle 15: Amplifizierung verschiedener chimärer PCR-Produkte unter Verwendung des Primers R 1**

Zweiter Primer	gag D	pol X	E 4	R 2
Größe des Fragments	1 778 bp	5 682 bp	6 827 bp	8 226 bp
Nachweis	positiv	positiv	positiv	negativ

**Tabelle 16: Amplifizierung verschiedener chimärer PCR-Produkte unter Verwendung des Primers R2**

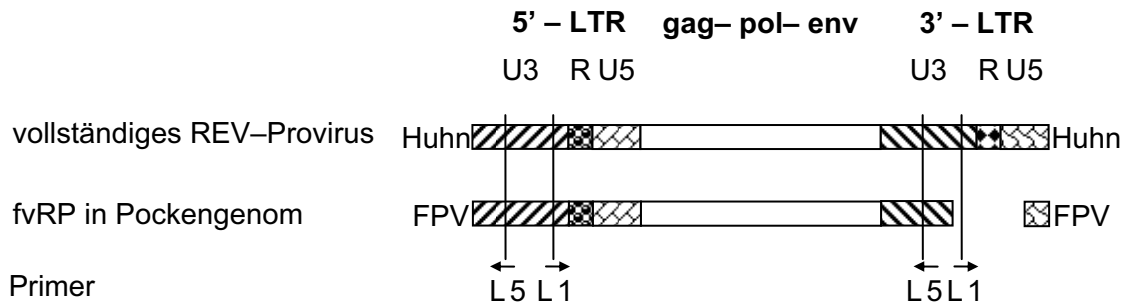
Zweiter Primer	E3	polO	gagC	R1
Größe des Fragments	2038 bp	3305 bp	6841 bp	8226 bp
Nachweis	positiv	negativ	negativ	negativ



**Abbildung 16: Lage verschiedener Primer im Bereich des integrierten fvRP; die Orientierung der Primer ist durch Pfeile wiedergegeben; nicht maßstabsgerecht**

#### 4.1.5.3 Nachweis des fvRP aus FPV-DNA mit den Primern L1 und L5

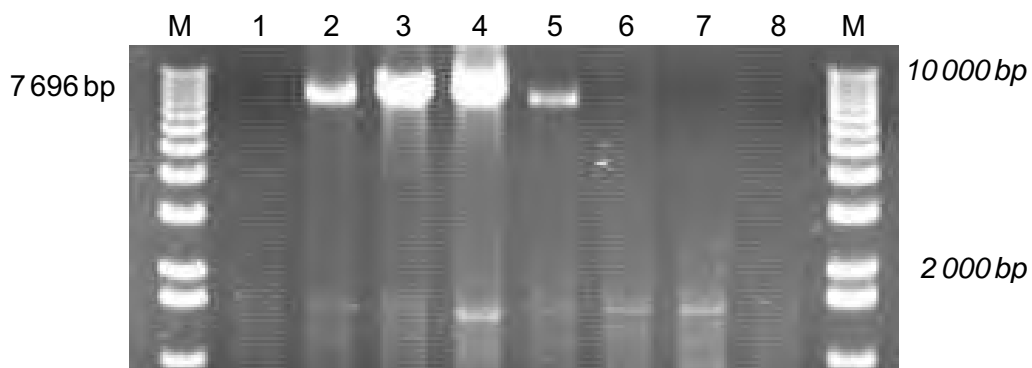
Da die Versuche zur Amplifikation des fvRP mit den Primern R1 und R2 erfolglos geblieben waren und auch die Anwendung der chimären PCRs keinen eindeutigen Lösungsansatz geliefert hatten, wurde mit den Primern L1 und L5 (Lage s. Abbildung 17) versucht, ein von den 5'-LTR zu den 3'-LTR reichendes, 7696bp langes Amplikon zu vervielfältigen. Wiederrum wurden mit der DNA des FPV-Feldisolates GB 285/04 (Nr. 35) Anlagerungstemperaturen von 57°C und 54°C, sowie verschiedene Primer- und Magnesiumkonzentrationen getestet, um die PCR zu optimieren (Tabelle 17, Abbildung 18). Eine Amplifikation war nur mit vier der getesteten Kombinationen möglich, wobei bei einer Anlagerungstemperatur von 57°C, je 2000µM der Primer und 2,5mM Magnesium sehr starke unspezifische Banden auftraten (Tabelle 17). Für die weiteren Untersuchungen wurde mit einer Anlagerungstemperatur von 57°C, je 2000µM der Primer und 1,5mM Magnesium gearbeitet.



**Abbildung 17: Position der Primer L1 und L5 im vollständigen, in das Hühner-Genom integrierten REV-Provirus und im in das FPV-Genom integrierten fvRP; die Orientierung der Primer ist durch Pfeile wiedergegeben; nicht maßstabsgerecht**

**Tabelle 17: Getestete Kombinationen aus unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen sowie Primer- und Magnesiumkonzentration als Reaktionsbedingungen zur Amplifikation des fvRP mit den Primern L1 und L5**

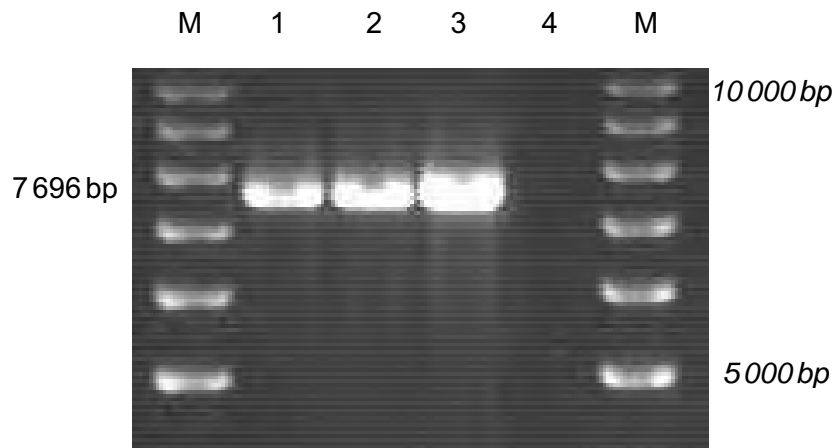
Anlagerungs-temperatur	Primer-konzentration	Magnesium-konzentration	Spur in Abbildung 18	Ergebnis
57 °C	Je 500 µM	1,5 mM	1	Keine Amplifikation
		2,5 mM	2	Amplifikation möglich
	Je 2000 µM	1,5 mM	3	Amplifikation möglich
		2,5 mM	4	Amplifikation möglich; unspezifische Banden
54 °C	Je 500 µM	1,5 mM	5	Amplifikation möglich
		2,5 mM	6	Keine Amplifikation
	Je 2000 µM	1,5 mM	7	Keine Amplifikation
		2,5 mM	8	Keine Amplifikation



**Abbildung 18: Versuch des Nachweises des fvRP mittels der Primer L1 und L5 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen; die Reaktionsbedingungen der auf die Spuren aufgetragenen PCR-Produkte sind in Tabelle 14 wiedergegeben. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.**

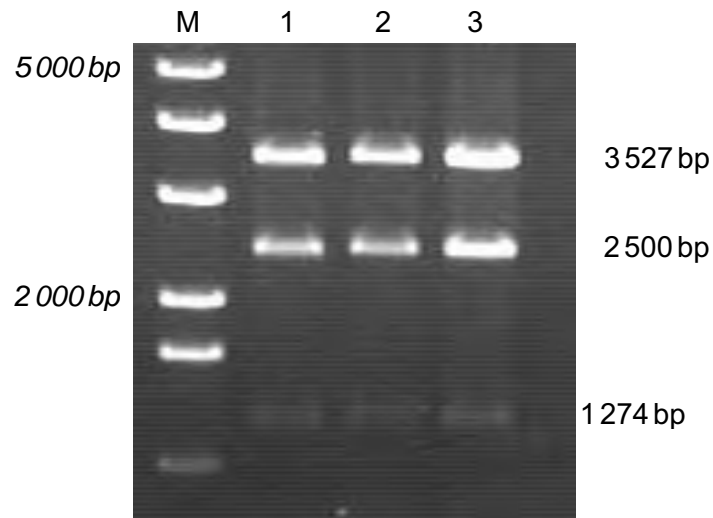


Mit den so optimierten Reaktionsbedingungen wurde versucht, das das fvRP umfassende PCR-Produkt aus der DNA der Feldisolate GB 1212/02 (Nr. 17), GB 869/02 (Nr. 11) und GB 285/04 (Nr. 35) sowie aus der proviralen DNA des CSV zu amplifizieren. In der DNA der FPV-Feldisolate war das Amplikon nachweisbar, die Amplifikation aus der proviralen CSV-DNA war nicht möglich (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Nachweis eines 7 696 bp großen, von den 3'-LTR zu den 5'-LTR des fvRP reichenden Amplikons mittels der Primer L 1 und L 5; M: 1 kbp-Marker; Spur 1: GB 1212/02 (Nr. 17); Spur 2: GB 869/02 (Nr. 11); Spur 3: GB 285/04 (Nr. 35); Spur 4: CSV. Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.

Die mittels der Primer L 1 und L 5 erhaltenen Amplikons aus den drei Feldisolaten wurden mit dem Enzym *Apa*I geschnitten. Die erhaltenen Fragmentgrößen entsprachen den erwarteten 3 527, 2 500 und 1 274 bp. Das im Verhältnis sehr kleine 395 bp lange Fragment war nicht darstellbar (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** REA des mit den Primern L 1 und L 5 gewonnenen Amplikons mit *Apal*  
**M:** 1 kbp-Marker; **Spur 1:** GB 1212/02 (Nr. 17); **Spur 2:** GB 869/02 (Nr. 11); **Spur 3:**  
 GB 285/04 (Nr. 35). Die Größen der Markerfragmente sind kursiv gedruckt.

#### 4.1.5.4 Versuch des Nachweises des fvRP aus CSV-DNA mit den Primern L 1 und L 5

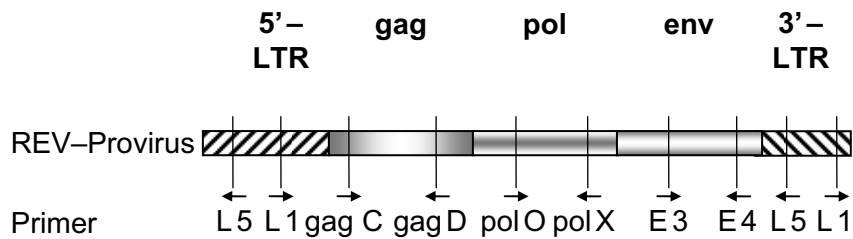
Um Hinweise auf die Ursache zu finden, warum der Nachweis des fvRP aus CSV-DNA mit den Primern L 1 und L 5 nicht gelungen war, und um sich an dessen Amplifikation anzunähern, wurde versucht, ausgehend von den Primern L 1 bzw. L 5 länger werdende PCR-Produkte zu amplifizieren (Tabelle 18 und Tabelle 19). Die Position der Primer innerhalb des REV-Provirus ist in Abbildung 21 wiedergegeben. Alle Amplikons, die nicht die 3'-LTR beinhalteten, konnten nachgewiesen werden. Ein die 3'-LTR umfassendes Amplikon konnte nur mittels der Primer E 3 und L 5 vervielfältigt werden.

**Tabelle 18: Amplifizierung verschiedener PCR-Produkte unter Verwendung des Primers L 1 aus proviraler REV-DNA**

Zweiter Primer	<i>gag D</i>	<i>pol X</i>	E 4	L 5
Größe des Fragments	1 483 bp	5 387 bp	6 532 bp	7 696 bp
Nachweis	positiv	positiv	positiv	negativ

**Tabelle 19: Amplifizierung verschiedener PCR-Produkte unter Verwendung des Primers L 5 aus proviraler REV-DNA**

Zweiter Primer	E 3	<i>pol O</i>	<i>gag C</i>	L 1
Größe des Fragments	1 807 bp	3 074 bp	6 604 bp	7 696 bp
Nachweis	positiv	negativ	negativ	negativ

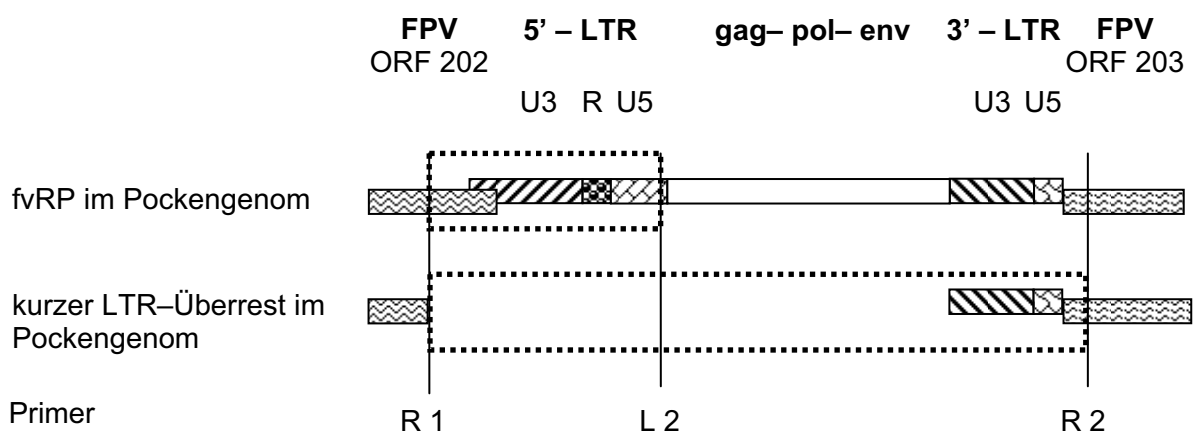


**Abbildung 21: Lage verschiedener Primer im REV-Provirus; die Orientierung der Primer ist durch Pfeile wiedergegeben; nicht maßstabsgerecht**

#### 4.1.6 REV-Provirus und Vergleich mit veröffentlichten Sequenzen

Um die Integrationsstelle des fvRP im Vakzinestamm HP B genauer zu charakterisieren, wurde das die Integrationsstelle beinhaltende PCR-Produkt (R1–R2) aus HP B amplifiziert, geklont und sequenziert.

In der DNA aus Feldausbrüchen in Amerika isolierter FPV wurde mit den Primern R1 und R2 sowohl ein fvRP von über 8000bp als auch ein 485bp großer Überrest der LTR nachgewiesen. Erklärt wurde dieser Befund mit dem gleichzeitigen Vorliegen zweier verschiedener Subpopulationen (Singh und Tripathy, 2000; 2003). Um die Verhältnisse an der Integrationsstelle eines deutschen Feldisolates genauer zu charakterisieren und mit den amerikanischen Ergebnissen zu vergleichen, wurden aus der DNA GB 869/02 (Nr. 11), die aus Originalmaterial hergestellt worden war, ausgehend von R1 das FPV-REV-chimäre PCR-Produkt (R1–L2) und das die Integrationsstelle umfassende PCR-Produkt (R1–R2) amplifiziert, geklont und sequenziert (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Schematische Darstellung der Lage der sequenzierten Bereiche (gestrichelt umrandet); nicht maßstabsgerecht**

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den entsprechenden Sequenzen amerikanischer Feldstämme (Singh und Tripathy, 2003) verglichen. In den Vergleich wurden entsprechende Abschnitte australischer Sequenzen, sowie des hochpassagierten europäischen Stammes HP 1 und des CSV mit einbezogen (Tabelle 20, Abbildung 23).

**Tabelle 20: Zum Vergleich herangezogene Sequenzen**

Beschriftung in Abbildung 23	Stamm	Accession-Nummer	Referenz
Am Fe L	fvRP im amerikanischen FPV-Feldisolat	AF246698	Singh et al., 2003
Au Vak 1	Australische Vakzine „Stamm S“ (5'-LTR, gag, pol)	AF006065	Hertig et al., 1997
Au Vak 2	Australische Vakzine „Stamm S“ (env, 3'-LTR)	AF006066	Hertig et al., 1997
Am Fe K	Integrationsstelle mit Überresten der LTR im amerikanischen FPV-Feldisolat	AY255633	Singh et al., 2003
HP 1	Integrationsstelle mit Überresten der LTR im FPV-Stamm HP 1	AJ581527	Laidlaw und Skinner, 2004
CSV	LTR von CSV	M22223	Swift et al., 1987

Stamm	PosNr.	Sequenz
		← FPV 202 →
Am Fe L	1	aaacaatgatacgtctcttctcctgctcgccggttaagggtgatttacggaacagtaacaatataa
Au Vak 1	1	.....
869 R1L2	1	*****.....c.....
Am Fe K	1	.....
HP 1	1	.....
869 R1R2	1	*****.....
HP B	1	*****.....
CSV		
		LTR U3 →
Am Fe L	61	aaagtgtggagggagctccggggggaatagcgctggctcgctaactgccatattagcttc
Au Vak 1	61	.....
869 R1L2	61	.....
Am Fe K	61	.....
HP 1	61	.....
869 R1R2	61	.....
HP B	61	.....
CSV	6	tgtg.....a.....

Am Fe L 121 tgtaatcatgcttgcttgcccttagccgccattgtacttgatatatctcgctgatattcatt  
 Au Vak 1 121 .....  
 869 R1L2 121 .....  
 Am Fe K 121 .....  
 HP 1 121 .....  
 869 R1R2 121 .....  
 HP B 121 .....  
 CSV 63 .....

Am Fe L 181 tctcgggaatcggcatcaagagcaggctcataaaccataaaaggaaatgtttgttgaaggc  
 Au Vak 1 181 .....  
 869 R1L2 181 .....  
 Am Fe K 181 .....  
 HP 1 181 .....  
 869 R1R2 181 .....  
 HP B 181 .....  
 CSV 123 .....

← FPV 202

Am Fe L 241 aagcatcagaccacttgccaccatccaatcacgaacaaacacgagatcgaactatcact  
 Au Vak 1 241 .....  
 869 R1L2 241 .....  
 Am Fe K 241 .....  
 HP 1 241 .....  
 869 R1R2 241 .....  
 HP B 241 .....  
 CSV 183 .....

Am Fe L 301 gagccaatgggtgtaaagggcagatgctatcctccaatgagggaaaatgtcatgcaacat  
 Au Vak 1 301 .....  
 869 R1L2 301 .....  
 Am Fe K 261 .....  
 HP 1 261 .....  
 869 R1R2 261 .....  
 HP B 261 .....  
 CSV 243 .....

←U3 R→

Am Fe L 361 cctgtaagcggctatataagccaggtgcattctcttgctcggggtcgccgtcctacacatt  
 Au Vak 1 361 .....  
 869 R1L2 361 .....  
 Am Fe K 261 .....  
 HP 1 261 .....  
 869 R1R2 261 .....  
 HP B 261 .....  
 CSV 303 .....

← R

Am Fe L 421 gttgtgacgtgcccagattcgaatctgtaataaaagctttttcttctatatcctcag  
 Au Vak 1 421 .....  
 869 R1L2 421 .....  
 Am Fe K 261 .....  
 HP 1 261 .....  
 869 R1R2 261 .....  
 HP B 261 .....  
 CSV 363 .....c.....

		U5 →		
Am Fe L	481	attggcagtgagaggagat	tttggctcgtgggtg	ttggctggcctactgggtggggtagga
Au Vak 1	481	.....		
869 R1L2	481	.....		
Am Fe K	261	-----		
HP 1	261	-----		
869 R1R2	261	-----		
HP B	261	-----		
CSV	423	.....		
				← U5-gag-pol-env-U3-R-U5→
Am Fe L	541	tccggactgaatccgtagtatttcggtacaacatt	7426 bp	actaggt
Au Vak 1/2	541	.....		.....
869 R1L2	541	.....		*****
Am Fe K	261	-----		.....
HP 1	261	-----		.....
869 R1R2	261	-----		.....
HP B	261	-----		.....
CSV	483	.....		
Am Fe L	8009	ggggcagcaggggtccggactgaatcgtagt	tcggtacaacag	tattattgtataat
Au Vak 2	635	.....		
Am Fe K	268	.....		
HP 1	268	.....		
869 R1R2	268	.....		
HP B	268	.....		
				FPV 203 →
Am Fe L	8069	attatattttgtaatatataaaaaaatagaaaataaataat	tattatttttataat	gga
Au Vak 2	695	.....		
Am Fe K	328	.....		
HP 1	328	.....		
869 R1R2	328	.....		
HP B	328	.....		
Am Fe L	8129	tattataactaataacaactatg	tttgatatacaatt	taacgatataccgaatatacccta
Au Vak 2	759	.....		
Am Fe K	388	.....		
HP 1	388	.....		
869 R1R2	388	.....		
HP B	388	.....		
Am Fe L	8189	tgtagatatagaaaagcccttatt	gggtatattc	
Au Vak 2	819	.....		
Am Fe K	448	.....		
HP 1	448	.....		
869 R1R2	448	.....		*****
HP B	448	.....		*****

**Abbildung 23: Vergleich veröffentlichter und eigener Sequenzen der Integrationsstelle des fvRP und der 5'–LTR des fvRP; Legende der Sequenzen s. Tabelle 20; Punkte bezeichnen konservierte Nukleotidpositionen, Striche Deletionen, die Primerbereiche sind mit Sternchen gekennzeichnet**

Durch die Amplifikation sowohl der Integrationsstelle mit dem LTR–Überrest als auch des chimären PCR–Produktes aus Originalmaterial konnte bestätigt werden, daß die beiden angenommenen Subpopulationen auch in Originalmaterial nebeneinander vorliegen. Die

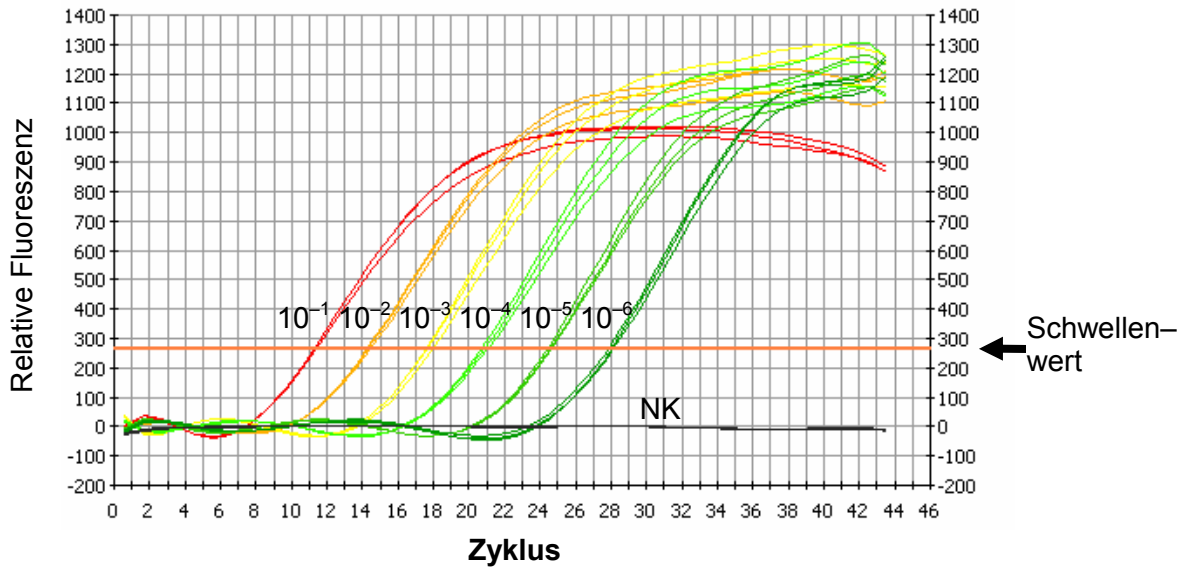
Sequenzierung der Integrationsstelle sowohl des Feldisolates als auch des Vakzinestammes ergaben, daß das die Integrationsstelle umfassende PCR-Produkt auch Überreste der LTR enthält. Der Sequenzvergleich zeigte mit Ausnahme einer Punktmutation keine Unterschiede zwischen den veröffentlichten Sequenzen und den Sequenzen des deutschen Feldisolates und der Vakzine. Hiermit bestätigte sich, daß die fraglichen Sequenzabschnitte hochkonserviert sind.

#### **4.1.7 Quantitative Untersuchungen über das Mengen-Verhältnis zwischen FPV-spezifischer DNA und REV-provirusspezifischer DNA**

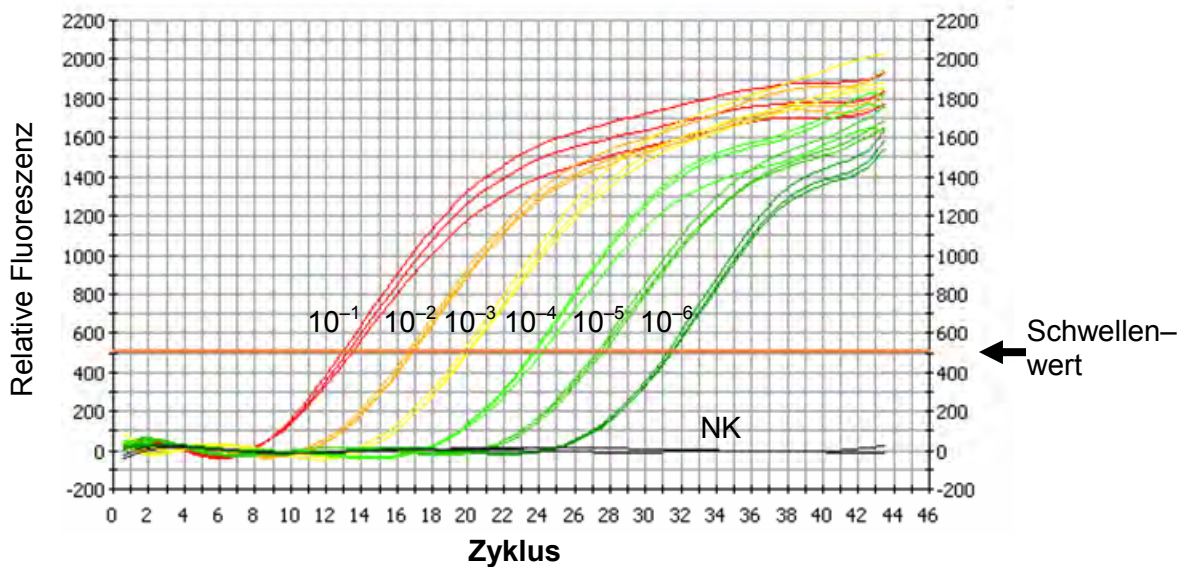
Mittels qPCR sollten das Verhältnis zwischen FPV-spezifischer DNA und REV-provirusspezifischer DNA in ausgewählten Feldisolaten und in verschiedenen Passagen des Feldisolates GB 869/02 (Nr. 11) auf LMH bestimmt werden.

##### 4.1.7.1 Bestimmung der Effizienzen der qPCR's

Für die folgenden Berechnungen mußten die Effizienzen der qPCRs zum Nachweis von FPV- und REV-DNA bekannt sein. Zu deren Bestimmung wurden die qPCR-Amplikons aus dem Bereich des FPV-4b-Core-Proteins (Primer qP 1 und qP 2) und des REV-gag (Primer qR 5 und qR 6) in Plasmide kloniert. Die Plasmid-DNA-Standards wurden im Volumen-Verhältnis 1:1 gemischt. Von dieser Mischung ausgehend wurde in Zehner-Schritten eine Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von  $1:10^6$  angelegt und von jeder Verdünnungsstufe drei Replikate mittels Multiplex-qPCR unter Verwendung der Primer qP 1, qP 2, qR 5 und qR 6 sowie der Sonden qP S und qR S untersucht (Abbildung 24).



A (FPV)

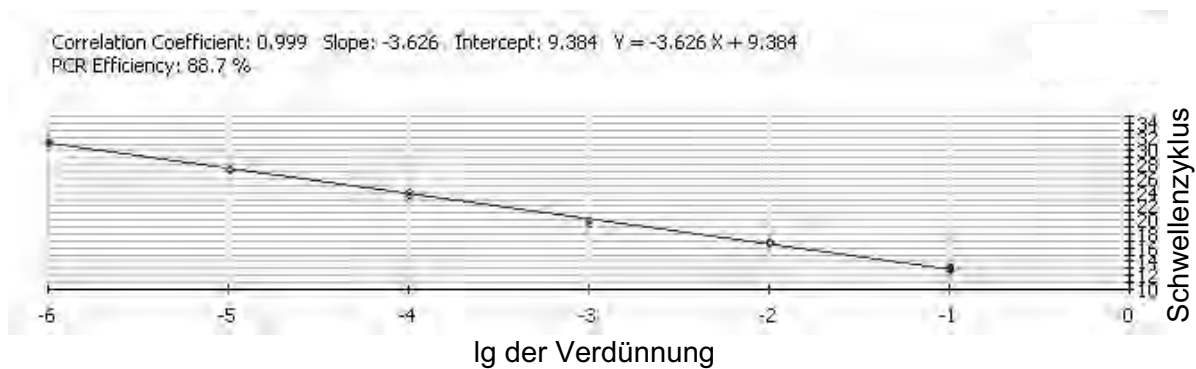
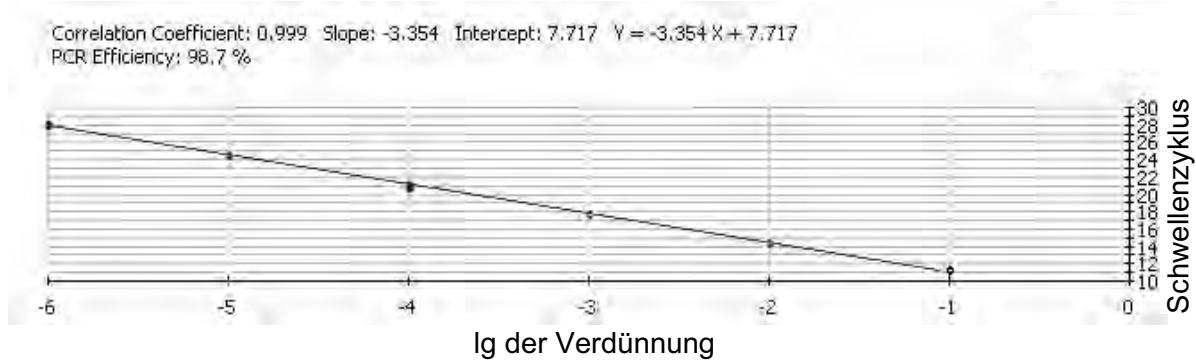


B (REV)

Abbildung 24 A, B: Amplifikations-Kurven der Verdünnungsreihe. Die jeweiligen Verdünnungsstufen der Triplets sind in die Kurven eingetragen, NK = Negativkontrolle; A: FPV-qPCR; B: REV-qPCR

Die Effizienz der Amplifizierung der FPV-DNA betrug 98,7%, die der Amplifizierung der proviralen REV-DNA 88,7% (Abbildung 25).





**Abbildung 25 A, B: Zur Berechnung der qPCR-Effizienzen aufgestellte Eichgeraden; A: FPV-qPCR; B: REV-qPCR**

#### 4.1.7.2 Einschätzung der Genauigkeit der angewandten Methode

Für die weiteren Untersuchungen wurde ein Standard, in dem FPV- und REV-Plasmid-DNA im Kopien-Verhältnis 1:1 vorlagen, hergestellt. Das Verhältnis zwischen FPV und REV-DNA in den untersuchten Proben wurde aus den Differenzen zwischen den jeweiligen Schwellenzyklen der unbekannt Probe und des bekannten Standards unter Einbeziehung der Effizienzen der qPCR's zum Nachweis von FPV- bzw. REV-DNA berechnet (Pfaffl, 2001).

Um die Genauigkeit der angewandten Methode einschätzen zu können, wurden in einem neuen PCR-Lauf von verschiedenen Verdünnungstufen des Standards je zwei Triplets untersucht. Da davon ausgegangen wurde, daß die DNA-Konzentrationen der Proben, die untersucht werden sollten, teilweise sehr gering waren, wurde auch eine Verdünnung von  $1:10^7$  einbezogen (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Ergebnisse der Untersuchung zur Einschätzung der Genauigkeit der angewandten Methode**

Verdünnung	FPV-DNA : REV-DNA		Differenz zwischen den Triplets (in % des Mittelwertes)
	Triplet A	Triplet B	
1:10	1:1,194	1:1,291	0,097 (7,8%)
1:10 <sup>3</sup>	1:2,023	1:1,807	0,216 (11,3%)
1:10 <sup>5</sup>	1:1,756	1:1,839	0,083 (4,6%)
1:10 <sup>7</sup>	1:2,146	1:2,432	0,286 (12,5%)

Die Ergebnisse zeigten, daß mit einem zufälligen Fehler, d.h. mit einer Differenz bei der mehrfachen Untersuchung einer Probe, von bis zu über 10% gerechnet werden mußte.

Außerdem mußte man davon ausgehen, daß ein systematischer Fehler insbesondere bei geringen Mengen eingesetzter DNA auftreten konnte, der zu einer Überschätzung des Verhältnisses zwischen FPV- und proviraler REV-DNA zu Gunsten der proviralen REV-DNA führte.

#### 4.1.7.3 Quantitative Untersuchung von Feldisolaten mittels qPCR

Die DNA der Feldisolate GB 869/02 (Nr. 11), GB 1212/02 (Nr. 17), GB 1340/02 (Nr. 21), GB 93/03 (Nr. 23), GB 285/04 (Nr. 35) und GB L8/04 (Nr. 40) wurden in Triplets mittels Multiplex-qPCR auf das Vorliegen FPV- und REV-proviraler Sequenzen untersucht. Aus der DNA der Feldisolate GB 869/02 (Nr. 11), GB 1212/02 (Nr. 17), GB 1340/02 (Nr. 21) und GB 285/04 (Nr. 35) waren in der Multiplex-PCR alle REV-Sequenzen nachgewiesen worden. Aus der DNA von GB 93/03 (Nr. 23) ließ sich nur das gag-Amplikon und mittels nPCR das env-Amplikon nachweisen und aus der DNA GB L8/04 (Nr. 40) nur mittels nPCR das env-Amplikon (Tabelle 22). Aus den beiden letztgenannten DNAs war auch der Nachweis des chimären PCR-Produktes nicht möglich gewesen.

Durch die quantitativen Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Untersuchung mittels der Multiplex-PCR auf einem unterschiedlichen Verhältnis zwischen FPV- und REV-DNA beruhten.

**Tabelle 22: Nachweis verschiedener REV-spezifischer Sequenzen bei den FPV-Isolaten, die zur quantitativen Untersuchung ausgewählt wurden**

Isolat	Nachweis des			
	LTR-Amplikon	gag-Amplikon	env-Amplikon	pol-Amplikon
mittels				
GB 869/02 (Nr. 11)	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR
GB 1212/02 (Nr. 17)	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR
GB 1340/02 (Nr. 21)	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR
GB 93/03 (Nr. 23)	Nicht möglich	Multiplex-PCR	nPCR	Nicht möglich
GB 285/04 (Nr. 35)	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR	Multiplex-PCR
GB L8/04 (Nr. 40)	Nicht möglich	Nicht möglich	nPCR	Nicht möglich

Das Verhältnis zwischen FPV-DNA und proviraler REV-DNA lag bei den Isolaten, bei denen sich alle REV-Sequenzen in der Multiplex-PCR nachweisen ließen, zwischen 1:0,803 und 1:1,411. Bei den anderen beiden Isolaten betrug es 1:3,393 bzw. 1:3,604 (Tabelle 23). Da jedoch bei den beiden DNA-Proben die FPV-Schwellenzyklen sehr hoch waren, deuteten diese Ergebnisse auf einen geringen Gehalt an FPV-DNA der Proben hin, so daß eine zuverlässige Aussage daraus nicht herzuleiten war.

**Tabelle 23: Verhältnis zwischen FPV- und proviraler REV-DNA in ausgewählten Feldisolaten**

Isolat	FPV-DNA : provirale REV-DNA
GB 869/02 (Nr.11)	1 : 1,180
GB 1212/02 (Nr. 17)	1 : 1,411
GB 1340/02 (Nr. 21)	1 : 0,955
GB 93/03 (Nr. 23)	1 : 3,393
GB 285/04 (Nr. 35)	1 : 0,803
GB L8/04 (Nr. 40)	1 : 3,604

#### 4.1.7.4 Quantitative Untersuchung verschiedener Passagen des Stammes 869/02 auf LMH

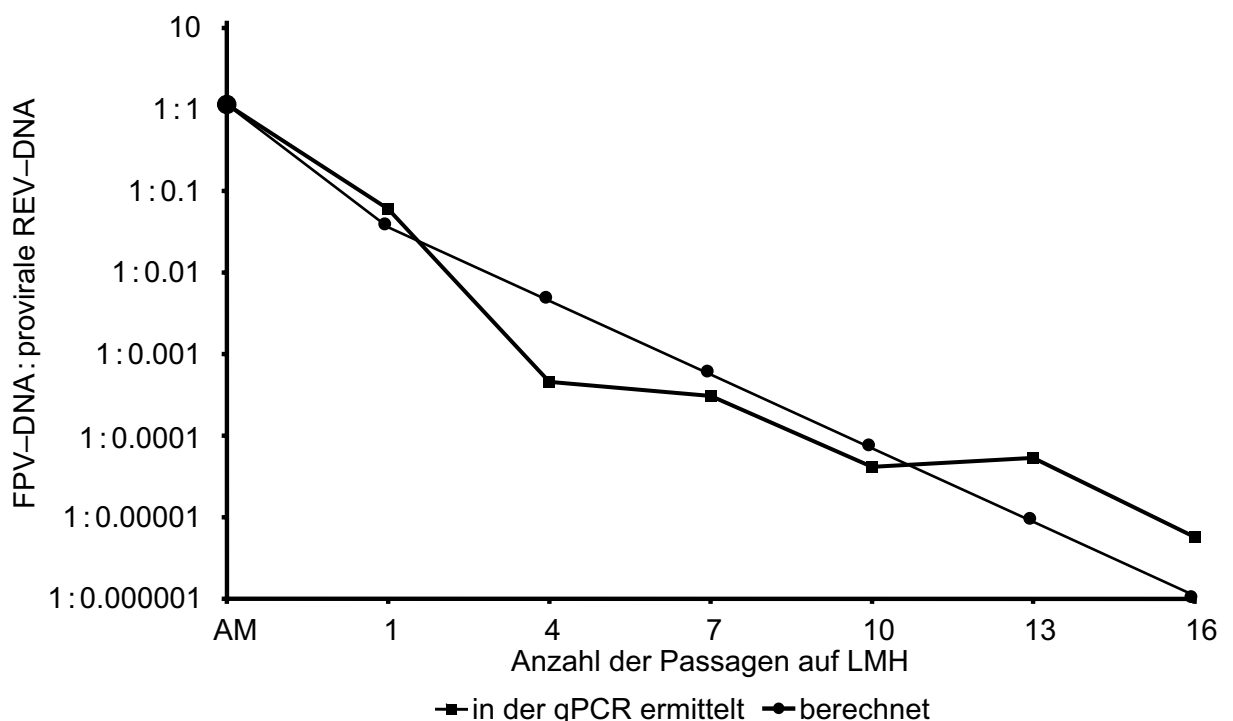
Um den von Singh et al. (2003) erwähnten Verlust des REV-Provirus bei wiederholter Passagierung quantitativ zu erfassen, wurde das FPV-Feldisolat GB 869/02 aus dem eingesandten Hautmaterial auf HEF isoliert und zunächst vier Mal auf diesem Zelltyp

passagiert. Anschließend wurde er 32 Mal auf LMH passagiert. Die DNA der 1., 4., 7., 10., 13., 16. und 32. Passage auf LMH wurden auf das Verhältnis zwischen FPV- und proviraler REV-DNA untersucht.

In der DNA aus der Feldprobe lagen FPV- und provirale REV-DNA nahezu im Verhältnis 1:1 vor. Der Verlust des REV verlief annähernd exponentiell mit einer Verlustrate von ca. 0,5 (50%) in jeder Passage. Abbildung 26 stellt den Verlauf des Mengenverhältnisses, das bei den Untersuchungen mittels qPCR ermittelt wurde, und des Mengenverhältnisses, das bei einer angenommenen Verlustrate von 50% pro Passage berechnet wurde, graphisch dar. Tabelle 24 gibt die in der qPCR erzielten Ergebnisse wieder.

In der 32. Passage war mittels qPCR keine REV-spezifische DNA mehr nachweisbar. Auf die Untersuchung höherer Passagen als der 16. wurde verzichtet, da Voruntersuchungen gezeigt hatten, daß bei einer sehr geringen Menge REV-provirus-spezifischer DNA die Schwellenzyklen innerhalb des untersuchten Triplets zu stark differierten.

Für den ersten Infektionsversuch (s. 4.3.1) war das FPV-Feldisolat sechs Mal auf HEF passagiert worden. Die sechste Passage auf HEF wurde in die Untersuchung mit einbezogen. In der 6. Passage auf HEF lag das FPV-REV-Verhältnis bei 1:0,009.



**Abbildung 26:** In der qPCR ermitteltes und berechnetes Verhältnis zwischen FPV- und proviraler REV-DNA in der DNA aus der Feldprobe (AM), der 1., 4., 7., 10., 13. und 16. Passage auf LMH

**Tabelle 24: Verhältnis zwischen FPV- und proviraler REV-DNA im Ausgangsmaterial (AM), der 1., 4., 7., 10., 13. und 16. Passage auf LMH sowie der 6. Passage auf HEF**

Material	FPV-DNA : provirale REV-DNA
Ausgangsmaterial	1 : 1,154
1. Passage auf LMH	1 : 0,06
4. Passage auf LMH	$1 : 4,574 \cdot 10^{-4}$
7. Passage auf LMH	$1 : 3,074 \cdot 10^{-4}$
10. Passage auf LMH	$1 : 4,144 \cdot 10^{-5}$
13. Passage auf LMH	$1 : 5,340 \cdot 10^{-5}$
16. Passage auf LMH	$1 : 5,737 \cdot 10^{-6}$
6. Passage auf HEF	1 : 0,009

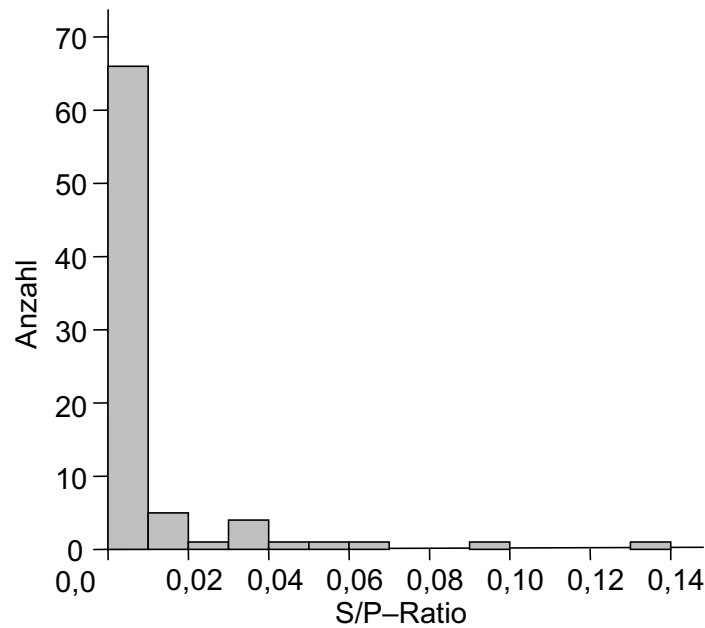
## 4.2 Serologische Untersuchungen

### 4.2.1 Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Pocken

Um die humorale Immunantwort gegen eine Infektion mit FPV zu untersuchen, wurde ein auf dem Prinzip der Positiv-Negativ-Beschichtung beruhender indirekter ELISA (Pocken-ELISA) entwickelt. Als positives Antigen wurde auf der Zelllinie LMH vermehrtes HP 1-Virus verwendet, als negatives Antigen nicht infizierte LMH-Zellen.

#### 4.2.1.1 Untersuchung von negativen und positiven Plasma- und Serumproben als Grundlage der Festlegung eines Schwellenwertes

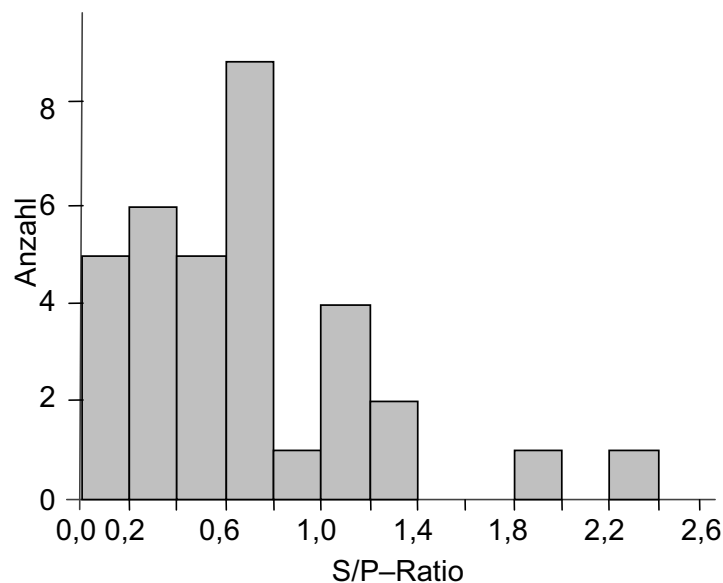
Um Anhaltspunkte für die Festlegung eines Schwellenwertes zu erhalten, wurden 81 Seren von SPF-Tieren im Pocken-ELISA untersucht. Das arithmetische Mittel der S/P-Ratios betrug 0,008, die Standardabweichung 0,022. Abbildung 27 zeigt das Histogramm der S/P-Ratios der SPF-Seren.



**Abbildung 27: Histogramm der S/P-Ratios der 81 im Pocken-ELISA untersuchten SPF-Seren**

Außerdem wurden 73 Plasma- und Serumproben von experimentell FPV-infizierten Tieren oder Tieren aus an Pocken erkrankten Wirtschaftsgeflügelbeständen mittels IIFT auf Antikörper gegen FPV untersucht, wobei 34 Plasma- bzw. Serumproben im IIFT Antikörper gegen FPV aufwiesen. Die restlichen Proben brachten negative Ergebnisse.

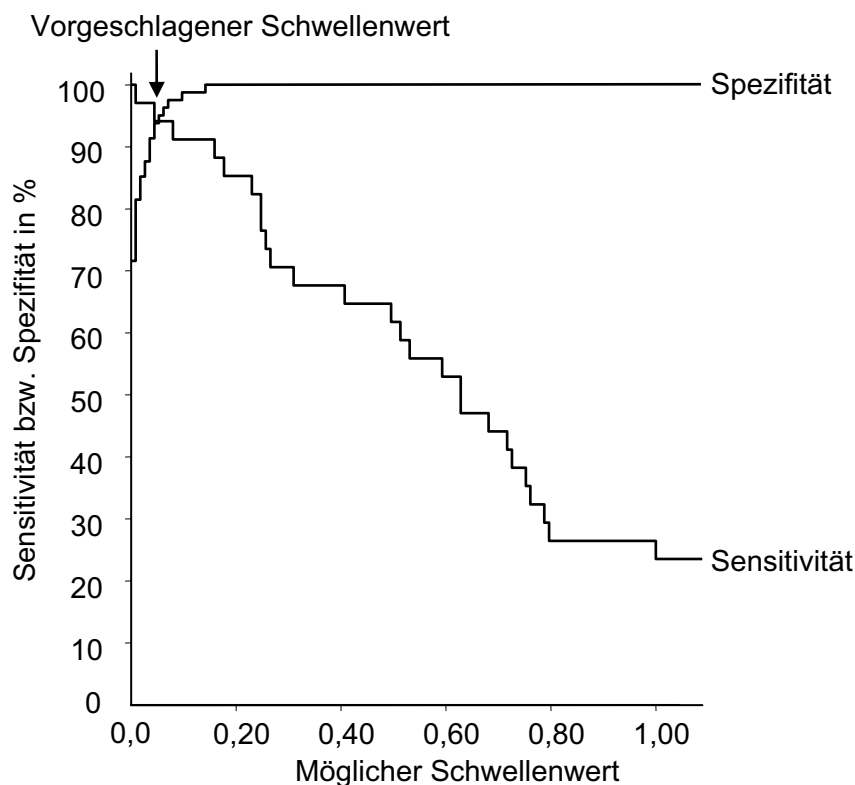
Diese 34 positiven Proben wurden im Pocken-ELISA untersucht. Das arithmetische Mittel der S/P-Ratios betrug 0,688, die Standardabweichung 0,518. Abbildung 28 zeigt das Histogramm der S/P-Ratios der 34 positiven Proben.



**Abbildung 28: Histogramm der S/P-Ratios der 34 im Pocken-ELISA untersuchten positiven Seren**

#### 4.2.1.2 Berechnung von Sensitivität und Spezifität für mögliche Schwellenwerte

Als mögliche Schwellenwerte wurden die Summe aus dem mittleren S/P-Ratio der SPF-Seren und der zwei- bzw. dreifachen Standardabweichung, der durch eine two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) Analyse (Greiner et al., 1995) ermittelte Wert 0,044, bei dem Sensitivität und Spezifität gleich hoch waren (Abbildung 29), sowie die Werte 0,1 und 0,2 in Betracht gezogen.



**Abbildung 29: TG-ROC-Analyse zur Optimierung von Sensitivität und Spezifität**

Für die in Betracht gezogenen Schwellenwerte wurden Sensitivität (Prozentsatz der im Pocken-ELISA positiv bewerteten Proben von den im IIFT positiven Proben) und Spezifität (Prozentsatz der im Pocken-ELISA negativ bewerteten Proben von allen negativen Proben) beim Nachweis von Antikörpern gegen FPV berechnet (Tabelle 26 bis Tabelle 30, zusammengefasst in Tabelle 25).

Die Sensitivität wurde beruhend auf den 34 mittels IIFT untersuchten positiven Plasma- und Serumproben berechnet. Zur Berechnung der Spezifität wurden als negative Plasma- bzw. Serumproben zusätzlich zu den 81 SPF-Seren 62 Seren aus nicht an Pocken erkrankten Beständen und 122 Plasmaproben von nicht infizierten Tieren aus den

Infektionsversuchen (s. 4.3) herangezogen. Somit wurde die Spezifität beruhend auf 265 negativen Seren und Plasmaproben berechnet.

**Tabelle 25: Spezifität und Sensitivität bei verschiedenen Grenzwerten**

Methoden	Schwellenwert	Sensitivität	Spezifität
TG–ROC–Analyse	0,044	94,1 %	92,8 %
$m + 2s^1$	0,052	94,1 %	94,3 %
$m + 3s$	0,074	91,2 %	97,4 %
Willkürlich	0,1	91,2 %	99,2 %
Willkürlich	0,2	85,3 %	100 %

<sup>1</sup>m = mittlerer S/P–Ratio der SPF–Seren; s = Standardabweichung

**Tabelle 26: Berechnung von Spezifität und Sensitivität bei einem angenommenen Schwellenwert von 0,044**

Seren von Tieren mit Antikörpern gegen FPV		Seren von nicht infizierten Tieren	
Falsch negativ	2	Richtig negativ	246
Richtig positiv	32	Falsch positiv	19
<b>Sensitivität</b>	<b>94,1 %</b>	<b>Spezifität</b>	<b>92,8 %</b>

Anzahl positiver Proben: 34, Anzahl negativer Proben: 265

**Tabelle 27: Berechnung von Spezifität und Sensitivität bei einem angenommenen Schwellenwert von 0,052**

Seren von Tieren mit Antikörpern gegen FPV		Seren von nicht infizierten Tieren	
Falsch negativ	2	Richtig negativ	250
Richtig positiv	32	Falsch positiv	15
<b>Sensitivität</b>	<b>94,1 %</b>	<b>Spezifität</b>	<b>94,3 %</b>

Anzahl positiver Proben: 34, Anzahl negativer Proben: 265



**Tabelle 28: Berechnung von Spezifität und Sensitivität bei einem angenommenen Schwellenwert von 0,074**

Serum von Tieren mit Antikörpern gegen FPV		Serum von nicht infizierten Tieren	
Falsch negativ	3	Richtig negativ	258
Richtig positiv	31	Falsch positiv	7
<b>Sensitivität</b>	<b>91,2 %</b>	<b>Spezifität</b>	<b>97,4 %</b>

Anzahl positiver Proben: 34, Anzahl negativer Proben: 265

**Tabelle 29: Berechnung von Spezifität und Sensitivität bei einem angenommenen Schwellenwert von 0,1**

Serum von Tieren mit Antikörpern gegen FPV		Serum von nicht infizierten Tieren	
Falsch negativ	3	Richtig negativ	263
Richtig positiv	31	Falsch positiv	2
<b>Sensitivität</b>	<b>91,2 %</b>	<b>Spezifität</b>	<b>99,2 %</b>

Anzahl positiver Proben: 34, Anzahl negativer Proben: 265

**Tabelle 30: Berechnung von Spezifität und Sensitivität bei einem angenommenen Schwellenwert von 0,2**

Serum von Tieren mit Antikörpern gegen FPV		Serum von nicht infizierten Tieren	
Falsch negativ	5	Richtig negativ	265
Richtig positiv	29	Falsch positiv	0
<b>Sensitivität</b>	<b>85,3 %</b>	<b>Spezifität</b>	<b>100 %</b>

Anzahl positiver Proben: 34, Anzahl negativer Proben: 265

Da die Plasma- und Serumproben nicht den Anforderungen an eine zufällige Stichprobe genügten, stellten die Berechnungen lediglich eine grobe Schätzung dar.

Für die weiteren Untersuchungen wurde eine hohe Spezifität wichtiger als eine hohe Sensitivität angesehen und der Wert 0,2 als Schwellenwert gewählt. S/P-Ratios zwischen 0,1 und 0,2 wurden als grenzwertig bewertet.

#### 4.2.1.3 Untersuchung heterologer Seren

Um die diagnostische Spezifität zu überprüfen, wurden insgesamt 17 Seren mit gegen andere Pathogene gerichteten Antikörpern untersucht (Tabelle 31). Keines der Seren hatte im Pocken-ELISA einen S/P-Ratio von über 0,07.

**Tabelle 31: Untersuchung heterologer Seren im Pocken-ELISA**

Pathogen, gegen das die Antikörper im Serum gerichtet waren	S/P-Ratio
Aviäres Leukose Virus	0,011
Aviäres Paramyxovirus 1 (Virus der Newcastle-Disease)	0,006
Mycoplasma meleagridis	0,028
Aviäres Pneumovirus	0
Gallide Herpesvirus 1 (Virus der Infektiösen Laryngotracheitis)	0
Virus der Infektiösen Bursitis (1)	0
Virus der Infektiösen Bursitis (2)	0
Reovirus (1)	0
Reovirus (2)	0
Aviäres Adenovirus, Serotyp 1	0,003
Aviäres Adenovirus, Serotyp 3	0,062
Aviäres Adenovirus, Serotyp 4	0
Aviäres Adenovirus, Serotyp 11	0,001
anti REV (1)	0,016
anti REV (2)	0
anti REV (3)	0,003
anti REV (4)	0,015

#### 4.2.1.4 Wiederholbarkeit der Ergebnisse im Pocken-ELISA

##### 4.2.1.4.1 *Intraassay-Vergleich*

Zunächst wurde die Wiederholbarkeit der Ergebnisse im Pocken-ELISA während eines Durchganges auf einer Platte überprüft. Dazu wurden ein stark positives Plasma 44 Mal und ein schwach positives und ein negatives Plasma je 22 mal auf derselben Platte getestet. Der Variationskoeffizient lag bei den beiden positiven Plasmaproben bei 4,3% bzw. 10,8% der Variationskoeffizient des negativen Serums bei 57% (Tabelle 32). Ein Variationskoeffizient von weniger als 20% deutet auf eine gute Wiederholbarkeit der Ergebnisse hin, bei Proben mit einem geringeren S/P-Ratio kann der Variationskoeffizient auch darüber liegen (Jacobson, 2004).

**Tabelle 32: Arithmetische Mittel der S/P-Ratios, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten des Intraassay-Vergleichs**

Plasma	Mittlerer S/P-Ratio	Standardabweichung	Variationskoeffizient
Stark positiv	0,832	0,035	4,3 %
Schwach positiv	0,267	0,029	10,8 %
Negativ	0,012	0,007	57 %

#### 4.2.1.4.2 Interassay-Vergleich

Anschließend wurde die Wiederholbarkeit der Ergebnisse zwischen mehreren Durchgängen im Pocken-ELISA überprüft. Die Untersuchungen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten mit jeweils neu angesetzten Puffern und Verdünnungen der Plasmaproben. Dieser Versuchsplan war gewählt worden, um die realen Gegebenheiten nachzuempfinden. Die Plasmaproben waren aliquotiert eingefroren, um den Einfluß mehrmaligen Friertauens der Plasmaproben auszuschließen. Vier positive Plasmaproben wurden je 14 Mal und ein negatives Plasma je 13 Mal zu verschiedenen Zeitpunkten auf 10 bzw. 9 verschiedenen Platten mitgeführt. Die Variationskoeffizienten der positiven Plasmaproben lagen zwischen 22 % und 33 %, der des negativen Plasmas bei 208,4 % (Tabelle 33). Die Ergebnisse waren somit nicht vollständig befriedigend, lagen jedoch mit weniger als 30 % bzw. knapp darüber, bei den positiven Proben noch im akzeptablen Bereich.

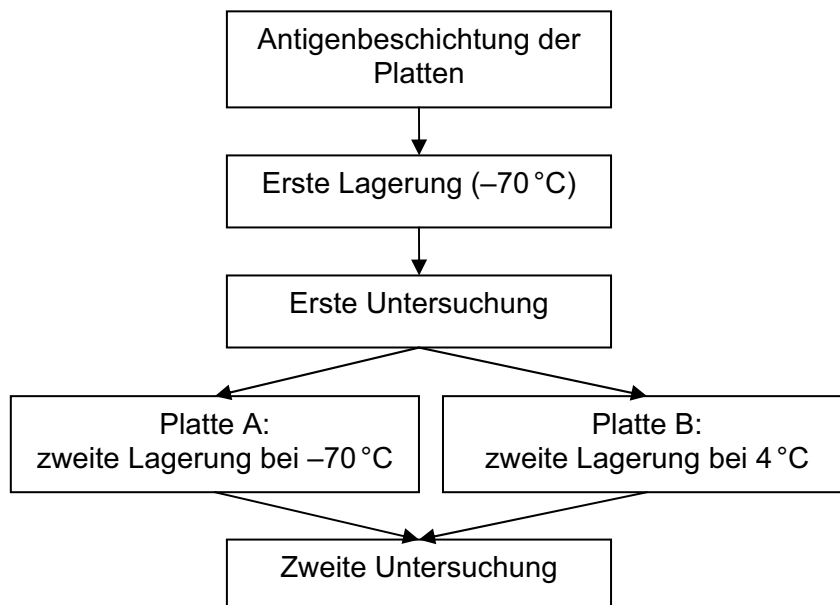
**Tabelle 33: Arithmetische Mittel der S/P-Ratios, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten des Interassay-Vergleichs**

Plasma	Mittlerer S/P-Ratio	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1 (positiv)	0,787	0,224	28,42 %
2 (positiv)	0,351	0,115	32,67 %
3 (positiv)	0,371	0,083	22,47 %
4 (positiv)	0,416	0,107	25,7 %
5 (negativ)	0,002	0,004	208,43 %

#### 4.2.1.4.3 Untersuchung möglicher Ursachen für das Ergebnis des Interassay-Vergleichs

Die Lagerungsdauer der Platten bei  $-70^{\circ}\text{C}$  zwischen der Antigenbeschichtung und der ersten Benutzung schien keinen Einfluß auf die Ergebnisse zu haben. Allerdings ergab sich die Fragestellung, ob die Abweichungen im Interassay-Vergleich darauf zurückzuführen waren, daß das Einfrieren und Auftauen einer Platte zwischen zwei Untersuchungen zu einer niedrigeren ODD und einem niedrigeren S/P-Ratio führte.

Deshalb wurde der Pocken-ELISA auf zwei ELISA-Platten durchgeführt. Dabei wurden in einem Untersuchungsgang ein stark und ein schwach positives Plasma je zehn Mal auf einer halben Platte untersucht. Anschließend wurde eine der beiden Platten bei  $-70^{\circ}\text{C}$  und die andere bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank eine Woche gelagert. Danach wurde der Pocken-ELISA auf den anderen Hälften der Platten und mit den gleichen Plasmaproben, die aliquotiert eingefroren gewesen waren, wiederholt (Abbildung 30, Tabelle 34).



**Abbildung 30: Schema des Versuchs über den Einfluß einer zweiten Lagerung einer Platte über eine Woche bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bzw. bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf die Höhe der ODD und des S/P-Ratios**

**Tabelle 34: Einfluß einer zweiten Lagerung der antigenbeschichteten ELISA-Platten über eine Woche bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bzw. bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf die Höhe der ODD und des S/P-Ratios**

Platte <sup>1</sup>	Plasma	Erste Untersuchung (vor der zweiten Lagerung)		Zweite Untersuchung (nach der zweiten Lagerung)	
		Mittlere ODD (Standard- abweichung)	Mittlerer S/P- Ratio (Standard- abweichung)	Mittlere ODD (Standard- abweichung)	Mittlerer S/P- Ratio (Standard- abweichung)
A	Stark positiv	1,182 (0,150)	0,714 (0,092)	0,628 (0,268)	0,521 (0,222)
B	Stark positiv	1,324 (0,111)	0,745 (0,061)	1,008 (0,264)	0,597 (0,155)
A	Schwach positiv	0,506 (0,067)	0,297 (0,041)	0,315 (0,119)	0,263 (0,098)
B	Schwach positiv	0,571 (0,032)	0,331 (0,018)	0,434 (0,096)	0,261 (0,056)

<sup>1</sup>Platte A wurde nach der ersten Untersuchung eine Woche bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert, Platte B bei  $4^{\circ}\text{C}$

Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse wurde der Einfluß einer möglichen Inhomogenität des Beschichtungsantigens und daraus evtl. resultierender Unterschiede in der Plattenbeschichtung, der Einfluß des Frier-Tauens bzw. der zweiten Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  sowie die Wechselwirkung der beiden Einflußfaktoren auf die Höhe der ODD bzw. des S/P-Ratios untersucht. Die Berechnung wurde für jedes Plasma getrennt durchgeführt (Tabelle 35, Tabelle 36, Abbildung 31).

Bei beiden Plasmaproben war der Einfluß der Plattenbeschichtung auf die Höhe der ODD, jedoch nicht auf die Höhe des S/P-Ratios signifikant. Die Unterschiede in der Plattenbeschichtung konnten also durch die Berechnung des S/P-Ratios ausgeglichen werden.

Bei dem stark positiven Plasma war der Einfluß des Frier-Tauens bzw. der zweiten Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  sowohl auf die ODD als auch auf den S/P-Ratio signifikant. Dies zeigte, daß das Antigen bei wiederholtem Einfrieren bzw. bei Lagerung im Kühlschrank über eine Woche nicht ausreichend stabil war. Dies konnte auch durch die Berechnung des S/P-Ratios nicht ausgeglichen werden. Bei dem schwach positiven Plasma war der Einfluß des Frier-Tauens bzw. der zweiten Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf die ODD, jedoch nicht auf den S/P-Ratio signifikant. Bei diesem Plasma kompensierte die Berechnung des S/P-Ratios also die mangelnde Stabilität des Beschichtungsantigens.

Ferner wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse berechnet, ob die Wechselwirkung von ELISA-Platte und zweiter Lagerung einen Einfluß auf die Ergebnisse hatte. Ein solcher

kombinierter Einfluß wäre auf die unterschiedliche zweite Lagerung der beiden Platten zurückzuführen gewesen und hätte eine Aussage erlaubt, ob die Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  mit Frier-Tauen oder die Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank das Ergebnis weniger beeinflusste. Die Wechselwirkung von Platte und zweiter Lagerung hatte jedoch bei beiden Seren keinen signifikanten Einfluß (Tabelle 35, Tabelle 36).

**Tabelle 35: Einfluß der Platte und der zweiten Lagerung auf die mittlere ODD und den mittleren S/P-Ratio des stark positiven Plasmas**

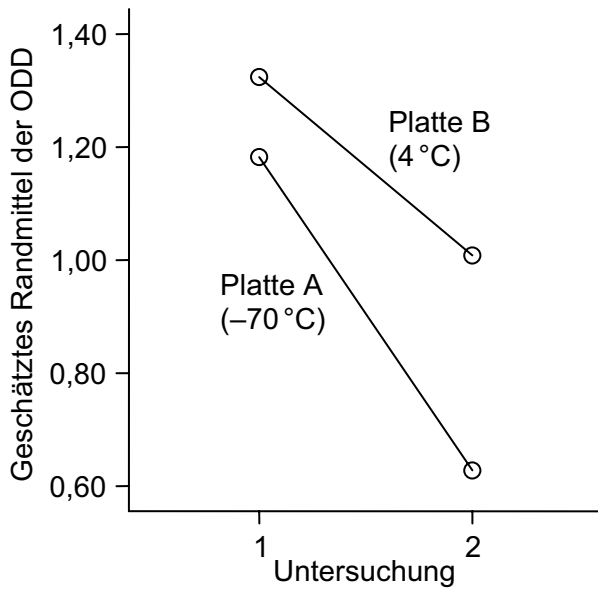
<b>Einfluß</b>	<b>auf die ODD</b>	<b>auf den S/P-Ratio</b>
der Platte	signifikant <sup>1</sup>	nicht signifikant
der zweiten Lagerung	signifikant	signifikant
Von Platte und zweiter Lagerung	nicht signifikant	nicht signifikant

<sup>1</sup> $\alpha = 0,05$

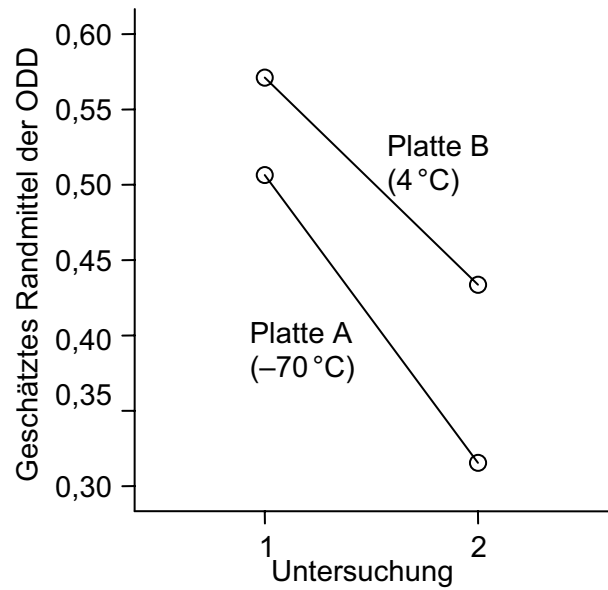
**Tabelle 36: Einfluß der Platte und der zweiten Lagerung auf die mittlere ODD und den mittleren S/P-Ratio des schwach positiven Plasmas**

<b>Einfluß</b>	<b>auf die ODD</b>	<b>auf den S/P-Ratio</b>
der Platte	signifikant <sup>1</sup>	nicht signifikant
der zweiten Lagerung	signifikant	nicht signifikant
Von Platte und zweiter Lagerung	nicht signifikant	nicht signifikant

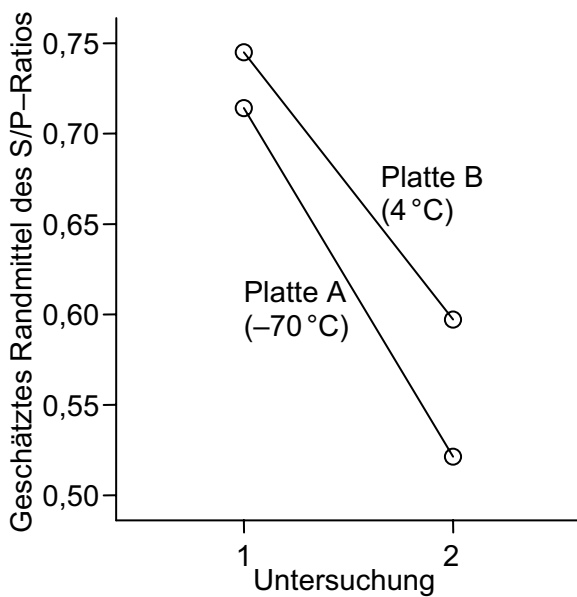
<sup>1</sup> $\alpha = 0,05$



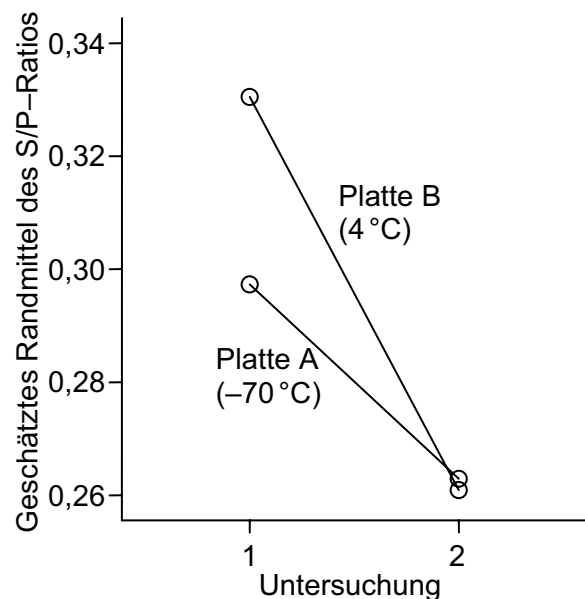
**A: Geschätzte Randmittel der ODD des stark positiven Plasmas**



**B: Geschätzte Randmittel der ODD des schwach positiven Plasmas**



**C: Geschätzte Randmittel des S/P-Ratios des stark positiven Plasmas**



**D: Geschätzte Randmittel des S/P-Ratios des schwach positiven Plasmas**

**Abbildung 31: Geschätzte Randmittel von ODD und S/P-Ratio der beiden untersuchten Plasmaproben**

#### 4.2.1.5 Vergleich der im Pocken-ELISA erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen im IIFT

Nach der Festlegung des Schwellenwertes sollten die Ergebnisse, die im IIFT erzielt worden waren, mit den Ergebnissen im Pocken-ELISA verglichen werden. Von den 34 im IIFT positiv beurteilten Plasma- bzw. Serumproben waren 29 im Pocken-ELISA positiv und zwei grenzwertig, während von den weiteren 39 Plasma- bzw. Serumproben, die im IIFT

negativ beurteilt worden waren, im Pocken–ELISA eine positiv und vier grenzwertig waren (Tabelle 37). Bei 86,3% der untersuchten Proben stimmten die im ELISA und im IIFT erzielten Ergebnisse überein. 8,2% der Proben wurden im ELISA als grenzwertig beurteilt und somit über sie keine eindeutige Aussage getroffen. Bei 5,5% der untersuchten Proben widersprachen sich die Ergebnisse im ELISA und im IIFT.

**Tabelle 37: Untersuchung von Plasma– bzw. Serumproben mittels IIFT und Pocken–ELISA**

Pocken–ELISA	IIFT		Gesamt
	Positiv	Negativ	
<b>Positiv</b>	29 (39,7%) <sup>1</sup>	1 (1,4%)	30
<b>Grenzwertig</b>	2 (2,7%)	4 (5,5%)	6
<b>Negativ</b>	3 (4,1%)	34 (46,6%)	37
<b>Gesamt</b>	34	39	73

<sup>1</sup>von allen untersuchten Proben

#### 4.2.1.6 Vergleich der im Pocken–ELISA erzielten Ergebnisse mit Ergebnissen im AGP

Um den Pocken–ELISA mit der am Institut für Geflügelkrankheiten etablierten Methode des Nachweises von Antikörpern gegen FPV mittels AGP zu vergleichen, wurden 198 Plasma– bzw. Serumproben sowohl mittels Pocken–ELISA als auch mittels AGP untersucht. Von ihnen waren 74 im AGP positiv. Im Pocken–ELISA wurden von denselben Plasma– und Serumproben 91 als positiv und 32 als grenzwertig bewertet. 59 Plasma– und Serumproben, die im AGP negativ waren, erwiesen sich im Pocken–ELISA als positiv oder grenzwertig, während nur 10 Plasma– und Serumproben, die im Pocken–ELISA ein negatives Ergebnis brachten, im AGP positiv waren (Tabelle 38). Bei 59,7% der untersuchten Proben stimmten die im ELISA und im AGP erzielten Ergebnisse überein. 16,2% der Proben wurden im ELISA als grenzwertig beurteilt, und somit keine eindeutige Aussage getroffen. Bei 24,2% der untersuchten Proben widersprachen sich die Ergebnisse im ELISA und im AGP. Somit war der Grad der Übereinstimmung zwischen ELISA und IIFT höher als zwischen ELISA und AGP. Fast 20% der Proben wurden im ELISA positiv, aber im AGP negativ bewertet. Dies spricht für eine höhere Sensitivität des ELISA.



**Tabelle 38: Untersuchung von Plasma- und Serumproben mittels AGP und Pocken-ELISA**

Pocken- ELISA	AGP		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	53 (26,8%) <sup>1</sup>	38 (19,2%)	91
Grenzwertig	11 (5,6%)	21 (10,6%)	32
Negativ	10 (5,0%)	65 (32,9%)	75
<b>Gesamt</b>	74	124	198

<sup>1</sup>von allen untersuchten Proben. Die Prozentwerte addieren sich wegen des Rundungsfehlers nicht auf 100 %.

#### 4.2.2 Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Antikörpern gegen FPV und REV in Seren aus Wirtschaftsgeflügelbeständen

Experimentelle Infektionen mit FPV mit integriertem fvRP können sowohl Antikörper gegen FPV als auch gegen REV hervorrufen (Hertig et al., 1997; Singh et al., 2000). Um einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Antikörpern gegen FPV und REV in Seren aus Wirtschaftsgeflügelbeständen festzustellen, wurden insgesamt 294 Seren aus 15 Herden, die entweder an Geflügelpocken erkrankt waren oder gegen sie geimpft waren, mittels ELISA auf Antikörper gegen FPV und REV untersucht. Außerdem wurden 26 Seren aus vier, nicht gegen FPV geimpften Herden, untersucht. In dem Problembestand, aus dem die Herden stammten, waren bei anderen Herden in den letzten Jahren häufig Hühnerpocken aufgetreten. Jedoch waren für diese speziellen Herden vorberichtlich keine pockentypischen Symptome bekannt.

142 Seren stammten aus fünf Herden, in denen eine FPV-Infektion aufgetreten war. Der Anteil der positiven Seren innerhalb einer erkrankten Herde reichte von 8,7 % bis 77,8 %. Bei vier Herden lag der Anteil der positiven Seren über 40 %, während eine Herde mit 8,7 % positiver Seren von den anderen stark abwich (Tabelle 39, Abbildung 32). 152 Seren stammten aus zehn Herden, die gegen FPV geimpft waren. Der Anteil der positiven Seren innerhalb einer erkrankten Herde reichte von 16,7 % bis 67,7 % (Tabelle 40, Abbildung 32). Die Spannweite des Anteils der positiven Seren war in den geimpften Herden somit geringer. Unterschiede im Anteil der Tiere mit Antikörpern gegen FPV ließen sich nicht zeigen.

Das Alter der geimpften Herden lag zwischen 18 und 34 Wochen. Da von einer Impfung um die zehnte Lebenswoche ausgegangen werden kann, lag die Impfung bei keiner Herde,

von der das Alter bekannt war, mehr als 15 Wochen zurück. Der Anteil von Tieren mit Antikörpern gegen FPV war nicht von dem zeitlichen Abstand zwischen Impfung und Blutentnahme abhängig.

Der Anteil der Seren mit Antikörpern gegen REV lag bei den erkrankten Herden zwischen 27,3 % und 100 %. Die Herde, die den geringsten Anteil von Seren mit Antikörpern gegen FPV aufgewiesen hatte, wies auch den geringsten Anteil von Seren mit Antikörpern gegen REV auf (Tabelle 39). Bei den geimpften Herden wiesen nur in zwei Herden 16,1 % bzw. 20 % der Tiere Antikörper gegen REV auf. In den Seren aus den anderen Herden waren keine Antikörper gegen REV nachweisbar (Tabelle 40).

Der Anteil der Seren mit Antikörpern gegen FPV lag bei den Herden aus dem Problembestand zwischen 16,7 % und 50 %. In keinem Serum konnten Antikörper gegen REV nachgewiesen werden (Tabelle 41).

**Tabelle 39: Auf Antikörper gegen FPV und REV untersuchte Seren aus an Geflügelpocken erkrankten Wirtschaftsgeflügelbeständen**

Bezeichnung	Anzahl	Pocken-ELISA (pos/gw/neg <sup>1</sup> )	REV-ELISA (pos/neg <sup>2</sup> )
GB 1022/02	23	2/0/21 (8,7 % / 0 % / 91,3 %)	6/16 <sup>3</sup> (27,3 % / 72,7 %)
GB 1116/02	15	6/2/7 (40 % / 13,3 % / 46,7 %)	12/3 (80 % / 20 %)
GB 94/03	60	39/9/12 (65 % / 15 % / 20 %)	43/17 (71,7 % / 28,3 %)
GB 226/04	26	11/3/12 (42,3 % / 11,5 % / 46,2 %)	26/0 (100 % / 0 %)
GB 766/04	18	14/3/1 (77,8 % / 16,7 % / 5,6 %)	18/0 (100 % / 0 %)

<sup>1</sup>positive Seren / grenzwertige Seren / negative Seren

<sup>2</sup>positive Seren / negative Seren

<sup>3</sup>Ein Serum stand zur Untersuchung gegen REV-Antikörper nicht mehr zur Verfügung.

Die Prozentwerte addieren sich teilweise wegen des Rundungsfehlers nicht auf 100 %.

**Tabelle 40: Auf Antikörper gegen FPV und REV untersuchte Seren aus gegen Geflügelpocken geimpften Wirtschaftsgeflügelbeständen**

Bezeichnung	Alter in Wochen <sup>1</sup>	Anzahl	Pocken-ELISA (pos/gw/neg <sup>2</sup> )	REV-ELISA (pos/neg <sup>3</sup> )
GB 677/04	k. A.	20	11/4/5 (55 %/20 %/25 %)	4/16 (20 %/80 %)
GB 943/04	k. A.	10	3/4/3 (30 %/40 %/30 %)	0/10 (0 %/100 %)
GB 1070/04	k. A.	10	1/4/5 (10 %/40 %/50 %)	0/10 (0 %/100 %)
GB 569/04	18	31	21/3/7 (67,7 %/9,7 %/22,6 %)	5/26 (16,1 %/83,9 %)
GB 1095/04	18	20	4/8/8 (20 %/40 %/40 %)	0/20 (0 %/100 %)
GB 1003/04	19	19	7/1/11 (36,8 %/5,3 %/57,9 %)	0/18 <sup>4</sup> (0 %/100 %)
GB 752/03	22	20	7/5/8 (35 %/25 %/40 %)	0/20 (0 %/100 %)
GB 722/04	22	6	2/1/3 (33,3 %/16,7 %/50 %)	0/6 (0 %/100 %)
GB 717/04	32	6	1/2/3 (16,7 %/33,3 %/50 %)	0/6 (0 %/100 %)
GB 1177/04	34	10	4/1/5 (40 %/10 %/50 %)	0/10 (0 %/100 %)

<sup>1</sup>Es kann von einer Impfung um die zehnte Lebenswoche ausgegangen werden

<sup>2</sup>positive Seren/grenzwertige Seren/negative Seren

<sup>3</sup>positive Seren/negative Seren

<sup>4</sup>Ein Serum stand zur Untersuchung gegen REV-Antikörper nicht mehr zu Verfügung

k. A. = keine Angaben

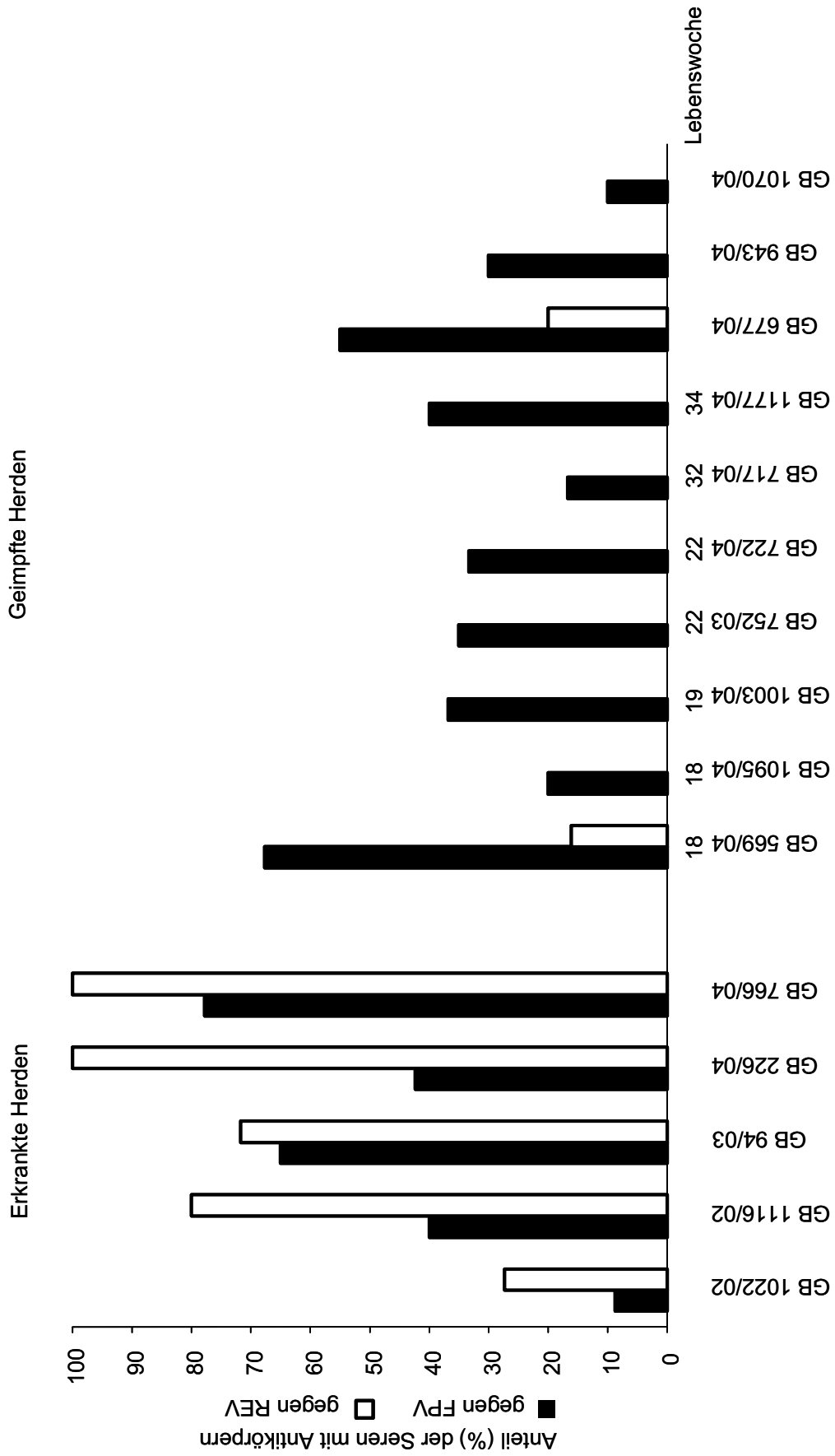


Abbildung 32: Untersuchung von Seren aus erkrankten und geimpften Herden auf Antikörper gegen FPV und REV

**Tabelle 41: Auf Antikörper gegen FPV und REV untersuchte Seren von vier Herden aus einem Problembestand**

Bezeichnung	Anzahl	Pocken-ELISA (pos/gw/neg <sup>1</sup> )	REV-ELISA (pos/neg <sup>2</sup> )
GB 719/04	7	3/1/3 (42,9% / 14,3% / 42,9%)	0/7 <sup>2</sup> (0% / 100%)
GB 720/04	6	1/1/4 (16,7% / 16,7% / 66,7%)	0/6 (0% / 100%)
GB 723/04	7	2/2/3 (28,6% / 28,6% / 42,9%)	0/7 (0% / 100%)
GB 724/04	6	3/0/3 (50% / 0% / 50%)	0/6 (0% / 100%)

<sup>1</sup>positive Seren/grenzwertige Seren/negative Seren

<sup>2</sup>positive Seren/negative Seren

Die Prozentwerte addieren sich teilweise wegen des Rundungsfehlers nicht auf 100%.

Innerhalb der Gruppe der erkrankten Tiere wurde der Zusammenhang zwischen der Antikörperbildung gegen FPV und REV untersucht (Tabelle 42). 41,1% der untersuchten Seren wiesen Antikörper sowohl gegen FPV als auch gegen REV auf. 22,7% hatten Antikörper gegen REV aber nicht gegen FPV und 9,9% Antikörper nur gegen FPV. Somit überwog die Zahl der Tiere, die Antikörper sowohl gegen FPV als auch gegen REV gebildet hatten. Dies ließ auf einen positiven Zusammenhang zwischen der Antikörperbildung gegen die beiden Pathogene schließen.

**Tabelle 42: Zusammenhang zwischen der Antikörperbildung gegen FPV und REV**

Pocken-ELISA	REV-ELISA		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	58 (41,1%) <sup>1</sup>	14 (9,9%)	72
Grenzwertig	15 (10,6%)	2 (1,4%)	17
Negativ	32 (22,7%)	20 (14,2%)	52
Gesamt	105	36	141

<sup>1</sup>von allen untersuchten Proben. Die Prozentwerte addieren sich wegen des Rundungsfehlers nicht auf 100%.

## 4.3 Infektionsversuche

### 4.3.1 Vergleich der humoralen Immunantwort nach Infektion mit einem attenuierten und einem pathogenen FPV–Stamm

Im Tierversuch sollte das deutsche Feldisolat GB 869/02 (Nr. 11), in das das fVRP integriert ist, und der in Deutschland zugelassene FPV–Impfstamm HP B, der lediglich die LTR–Überreste trägt, auf die Fähigkeit, Antikörper gegen FPV und REV zu induzieren, untersucht werden.

Das Feldisolat GB 869/02 wurde aus dem eingesandten Hautmaterial auf HEF isoliert und sechs Mal passagiert. Das Verhältnis von FPV–DNA zu REV–DNA betrug 1:0,009 (Tabelle 24). Um den Einfluß der Infektionsdosis festzustellen, wurden je 15 SPF–Eintagsküken intrakutan mit Zellkulturmaterial mit einem Virusgehalt von  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml bzw.  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml infiziert. 10 Eintagsküken wurden ebenfalls intrakutan mit je  $10^2$  EID<sub>50</sub> HP B vakziniert. 10 weitere Tiere dienten als nicht infizierte Kontrolle.

Die drei infizierten bzw. vakzinierten Gruppen wurden nach fünf Wochen erneut mit  $10^5$  TCID<sub>50</sub> desselben Stammes intravenös infiziert, um den Effekt einer Boosterung mit homologem Virus bzw. eines Challenge mit Feldvirus auf die Antikörperbildung gegen FPV und REV auszutesten (Tabelle 43).

**Tabelle 43: Versuchsgruppen im ersten Infektionsversuch**

Gruppe	Anzahl Tiere	Erste Infektion			Zweite Infektion		
		Virus	Virustiter	Infektionsroute	Virus	Infektionsdosis	Infektionsroute
I	15	869/02	$10^6$ TCID <sub>50</sub> /ml <sup>1</sup>	intrakutan	869/02	$10^5$ TCID <sub>50</sub>	i.v.
II	15	869/02	$10^4$ TCID <sub>50</sub> /ml <sup>1</sup>	intrakutan	869/02	$10^5$ TCID <sub>50</sub>	i.v.
III	10	HP–B	$10^2$ EID <sub>50</sub> /Tier <sup>2</sup>	intrakutan	869/02	$10^5$ TCID <sub>50</sub>	i.v.
N	10	Zellkulturmedium		intrakutan	–	–	–

<sup>1</sup>Bei Infektion mittels der Wing–Web–Methode ist eine genaue Angabe der Dosis, die jedes Tier erhalten hat, nicht möglich

<sup>2</sup>gemäß den Angaben des Herstellers

#### 4.3.1.1 Klinische Erscheinungen und Sektionen

Alle Tiere der infizierten bzw. geimpften Gruppen zeigten eine Woche nach der intrakutanen Infektion bzw. Impfung eine Impfpocke. Zu keinem Zeitpunkt traten klinische Symptome einer FPV– oder REV–Erkrankung auf.

Je eine Woche nach erster Infektion und Zweitinfektion wurde an drei bzw. zwei Tieren pro Gruppe eine pathologisch–anatomische Untersuchung durchgeführt. Dabei wurden

Hautproben von der Infektionsstelle und Leberproben genommen. Die seziierten Tiere zeigten keine pathomorphologischen Veränderungen.

#### 4.3.1.2 Antikörperbildung gegen FPV

Blutproben wurden von den eine Woche nach der Erstinfektion getöteten Tieren, sowie von allen Tieren zwei, drei und vier Wochen nach der Erstinfektion und eine, zwei, drei und vier Wochen nach der Zweitinfektion entnommen und mittels ELISA auf Antikörper gegen FPV untersucht.

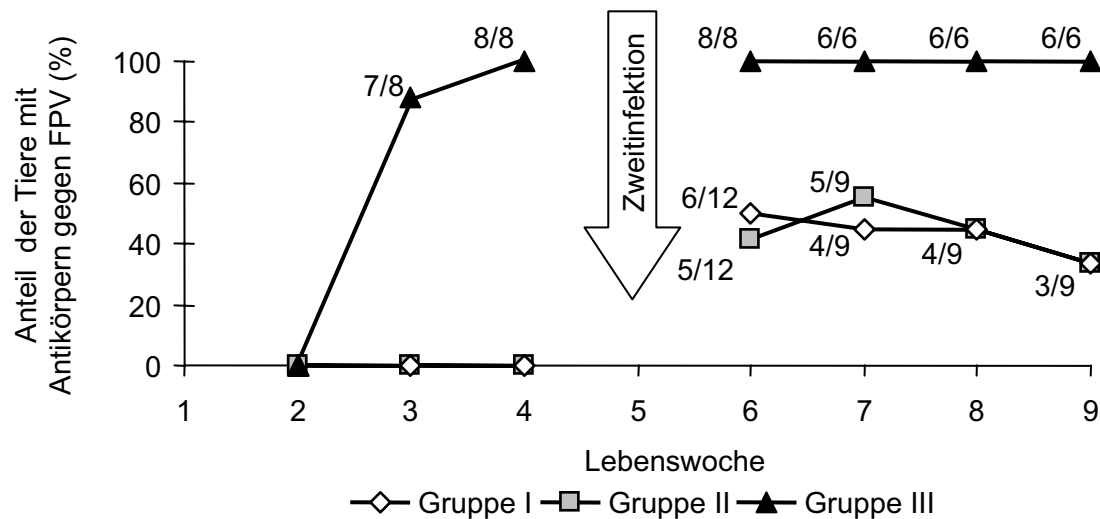
Nach der intrakutanen Infektion entwickelte kein Küken der Gruppen I und II (Infektion mit dem Feldisolat) einen positiven Antikörper-Titer gegen FPV. Vier Wochen nach der Infektion reagierten zwei Seren von Tieren der Gruppe I (hohe Dosis) im Grenzbereich. Im Gegensatz dazu entwickelten alle Küken der Gruppe III (HP B) Antikörper gegen FPV.

Nach der intravenösen Zweitinfektion mit dem Feldisolat entwickelten sechs Tiere der Gruppe I und sechs Tiere der Gruppe II, jedoch nur maximal fünf bei einer Probennahme, im FPV-ELISA einen S/P-Ratio über 0,2. Alle Tiere der Gruppe III blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum FPV-seropositiv (Tabelle 44, Abbildung 33). Kein Tier der Negativkontrolle entwickelte Antikörper gegen FPV.

**Tabelle 44: Ergebnisse der Untersuchung auf Antikörper gegen FPV in den Gruppen I (Feldisolat  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml), II (Feldisolat  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml) und III (HP B  $10^2$  EID<sub>50</sub>/Tier)**

Woche	Gruppe I (pos/gw/neg <sup>1</sup> )	Gruppe II (pos/gw/neg <sup>1</sup> )	Gruppe III (pos/gw/neg <sup>1</sup> )
<b>1. Tag: Intrakutane Infektion</b>			
1. Woche	0/0/3	0/0/3	0/0/2
2. Woche	0/0/11	0/0/12	0/0/7
3. Woche	0/0/11	0/0/12	7/1/0
4. Woche	0/2/10	0/0/12	8/0/0
<b>5. Woche: Zweitinfektion mit <math>10^5</math> TCID<sub>50</sub> Feldisolat i.v.</b>			
6. Woche	6/1/5	5/3/4	8/0/0
7. Woche	4/0/5	5/2/2	6/0/0
8. Woche	4/0/5	4/1/4	6/0/0
9. Woche	3/1/5	3/2/4	6/0/0

<sup>1</sup>positive Plasmaproben / grenzwertige Plasmaproben / negative Plasmaproben



**Abbildung 33:** Anteil der Tiere mit Antikörpern gegen FPV in den Gruppen I (Feldisolat  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml), II (Feldisolat  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml) und III (HP B  $10^2$  EID<sub>50</sub>/Tier); die Anzahl der positiven und der untersuchten Proben ist im Diagramm angegeben

#### 4.3.1.3 Antikörperbildung gegen REV

Alle Blutproben wurden auch mittels ELISA auf Antikörper gegen REV untersucht.

Nach der Erstinfektion entwickelten elf bzw. vier Küken der mit dem Feldisolat infizierten Gruppen I und II REV-spezifische Antikörper. Im Gegensatz dazu wies kein Küken der Gruppe III, die den Impfstamm HP B erhalten hatte, einen positiven REV-Titer auf.

Nach der Zweitinfektion zeigten alle Tiere der Gruppe I (hohe Dosis) und fünf von neun Tieren der Gruppe II (niedrige Dosis) eine Antikörperentwicklung gegen REV, aber kein Tier der Gruppe III entwickelte positive REV-Titer (Tabelle 45, Abbildung 34).

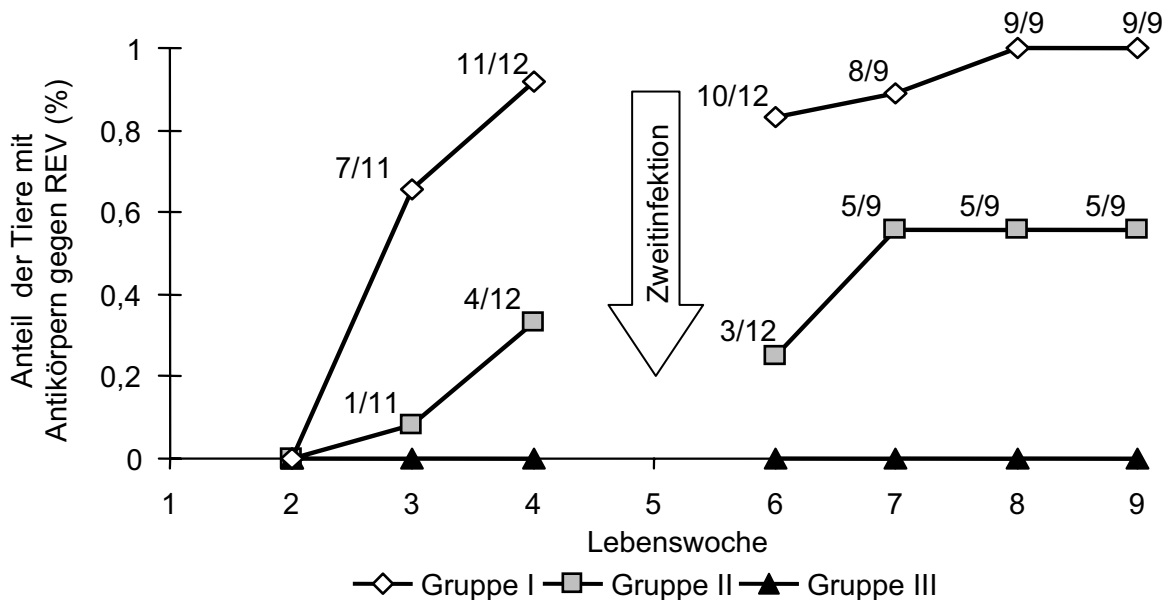
Die Tiere, die als Negativkontrolle gehalten wurden, entwickelten während der gesamten Versuchsdauer keine Antikörper gegen REV.



**Tabelle 45: Ergebnisse der Untersuchung auf Antikörper gegen REV in den Gruppen I (Feldisolat  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml), II (Feldisolat  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml) und III (HP B  $10^2$  EID<sub>50</sub>/Tier)**

Woche	Gruppe I (pos/neg <sup>1</sup> )	Gruppe II (pos/neg <sup>1</sup> )	Gruppe III (pos/neg <sup>1</sup> )
<b>1. Tag: Intrakutane Infektion</b>			
1. Woche	0/3	0/3	0/2
2. Woche	0/11	0/12	0/7
3. Woche	7/4	1/11	0/8
4. Woche	11/1	4/8	0/8
<b>5. Woche: Zweitinfektion mit <math>10^4</math> TCID<sub>50</sub> Feldisolat i.v.</b>			
6. Woche	10/2	3/9	0/8
7. Woche	8/1	5/4	0/6
8. Woche	9/0	5/4	0/6
9. Woche	9/0	5/4	0/6

<sup>1</sup>positive Plasmaproben / negative Plasmaproben



**Abbildung 34: Anteil der Tiere mit Antikörpern gegen REV in den Gruppen I (Feldisolat  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml), II (Feldisolat  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml) und III (HP B  $10^2$  EID<sub>50</sub>/Tier); die Anzahl der positiven und der untersuchten Proben ist im Diagramm angegeben**

#### 4.3.1.4 Untersuchung von Gewebeproben mittels PCR

Eine Woche nach der Erstinfektion wurde an drei bzw. zwei Tieren pro Gruppe eine pathologisch–anatomische Untersuchung durchgeführt. Dabei wurden Hautproben von der Infektionsstelle und Leberproben genommen. Die Proben wurden mittels PCR mit den Primerpaaren FP1 und FP2 bzw. E3 und E4 auf FPV–DNA bzw. provirale REV–DNA untersucht. Wegen der höheren Sensitivität der Uniplex–PCRs wurde auf den Einsatz der Multiplex–PCR verzichtet.

Eine Woche nach der ersten Infektion konnte in der Haut der Infektionsstelle bei allen untersuchten Tieren der Gruppen I bis III FPV–spezifische DNA festgestellt werden, bei den Tieren der Gruppen I und II zusätzlich auch REV–Provirus–spezifische DNA. In den Leberproben konnte zu diesem Zeitpunkt keine FPV– oder REV–Provirus–spezifische DNA nachgewiesen werden.

Eine Woche nach der Zweitinfektion wurde an drei bzw. zwei Tieren pro Gruppe eine pathologisch–anatomische Untersuchung durchgeführt. Dabei wurden Leberproben genommen. In einer von drei Leberproben der Gruppe I bzw. in zwei von drei Leberproben der Gruppe II konnte FPV–spezifische DNA nachgewiesen werden. In beiden Leberproben der Gruppe III war keine FPV–DNA nachweisbar. REV–Provirus–spezifische DNA konnte in allen sechs untersuchten Leberproben der Gruppen I und II nachgewiesen werden, jedoch nicht in den Lebern der Gruppe III. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 46 zusammengestellt.

In den Haut– und Leber–Proben der Negativkontrolle konnte weder FPV–spezifische noch REV–Provirus–spezifische DNA nachgewiesen werden.

#### 4.3.1.5 Untersuchung von PBMC mittels PCR

Aus den Blutproben, die vier Wochen nach der ersten Infektion sowie ein und vier Wochen nach der Zweitinfektion genommen wurden, wurden die PBMC präpariert und wie die Gewebeproben untersucht. Bei negativen PCR–Ergebnissen aus den PBMC wurde mittels PCR zum Nachweis des  $\beta$ –Aktin Gens sichergestellt, daß die DNA–Extraktion nicht fehlerhaft waren. Da in der PCR zum Nachweis von REV aus PBMC unspezifische Banden zu zweifelhaften Ergebnissen führten, mußten einige PCR–Produkte mittels Dot–Blot weiter untersucht werden. Die Sonde wurde aus dem PCR–Produkt des Primerpaares E5 und E6, das innerhalb des PCR–Produktes aus E3 und E4 liegt, aus CSV–DNA hergestellt.

Vier Wochen nach der Erstinfektion konnte REV–Provirus–spezifische DNA in allen untersuchten PBMC der Gruppe I und einem Drittel der untersuchten PBMC der Gruppe II, jedoch nicht in PBMC der Gruppe III nachgewiesen werden. Ein Nachweis FPV–spezifischer DNA in den PBMC war zu diesem Zeitpunkt nicht möglich (Abbildung 35).

Eine Woche nach der Zweitinfektion war bei vier von fünf bzw. einem von zwei untersuchten PBMC der Gruppen I bzw. II REV-Provirus-spezifische DNA nachweisbar, aber wiederum keine in den PBMC der Gruppe III.

Vier Wochen nach der Zweitinfektion war REV-Provirus-spezifische DNA in allen untersuchten PBMC der Gruppe I, in sechs von acht der Gruppe II und erstmals in einem von fünf der Gruppe III nachweisbar.

Bei der Untersuchung der PBMC auf FPV-spezifische DNA gelang nur einmal, bei einem Tier der Gruppe I eine Woche nach der Zweitinfektion, der Nachweis.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 46 zusammengestellt.

In den PBMC der Negativkontrolle konnte weder FPV-spezifische noch REV-Provirus-spezifische DNA nachgewiesen werden.

**Tabelle 46: Nachweis von FPV- und REV-Provirus-spezifischer DNA aus Haut- und Leberproben sowie PBMC zu verschiedenen Zeitpunkten**

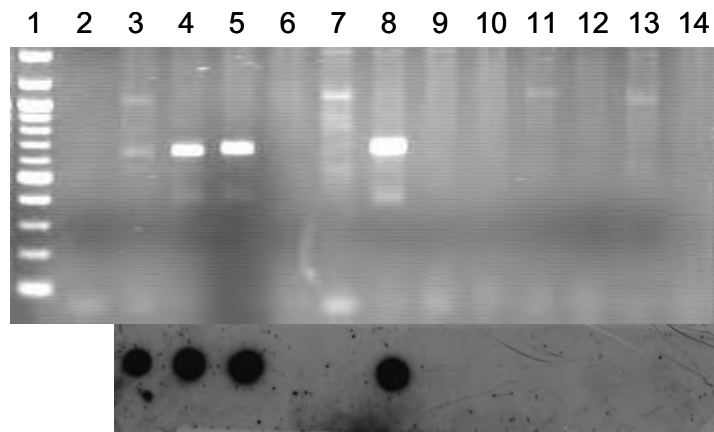
Woche	Organ	PCR	Gruppe I <sup>1</sup> (pos/neg <sup>4</sup> )	Gruppe II <sup>2</sup> (pos/neg <sup>4</sup> )	Gruppe III <sup>3</sup> (pos/neg <sup>4</sup> )
<b>1. Tag: Intrakutane Infektion</b>					
1. Woche	Haut	FPV	3/0	3/0	2/0
		REV	3/0	3/0	0/2
	Leber	FPV	0/3	0/3	0/2
		REV	0/3	0/3	0/2
4. Woche	PBMC	FPV	0/8	0/9	0/3
		REV	8/0	3/6	0/3
<b>5. Woche: Zweitinfektion mit 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> Feldisolat i.v.</b>					
6. Woche	Leber	FPV	1/2	2/1	0/2
		REV	3/0	3/0	0/2
	PBMC	FPV	1/4	0/2	0/4
		REV	4/1	1/1	0/4
9. Woche	PBMC	FPV	0/9	0/8	0/5
		REV	9/0	6/2	1/4

<sup>1</sup>erste Infektion intrakutan mit 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml Feldisolat

<sup>2</sup>erste Infektion intrakutan mit 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml Feldisolat

<sup>3</sup>erste Infektion intrakutan mit 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/Tier

<sup>4</sup>positive Plasmaproben/negative Plasmaproben



**Abbildung 35: PCR und Dot-Blot zum Nachweis von REV-DNA in PBMC; vier Wochen nach erstmaliger, intrakutaner Infektion; 1: 100 bp-Marker; 2: Negativkontrolle; 3 – 5: Tiere aus Gruppe I (Infektion mit unverdünntem Feldisolat); 6 – 8: Tiere aus Gruppe II (Infektion mit 1:100 verdünntem Feldisolat); 9 – 10: Tiere aus Gruppe III (Infektion mit kommerzieller Vakzine); 12 – 14: Tiere der Negativ-Gruppe**

#### 4.3.1.6 Zusammenhang zwischen Antikörperbildung gegen REV und Nachweis von REV-Provirus-spezifischer DNA in PBMC

Um zu ermitteln, ob ein Zusammenhang zwischen der Antikörperbildung gegen REV und dem Nachweis von REV-Provirus-spezifischer DNA in den PBMC vorlag, wurde dem Ergebnis der Untersuchungen der PBMC auf REV-spezifische DNA gegenübergestellt, ob das Tier zum Zeitpunkt der Entnahme der PBMC Antikörper gegen REV entwickelt hatte. Es wurden nur PBMC einbezogen, die von Tieren stammten, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit dem REV-haltigen Feldisolat infiziert waren.

**Tabelle 47: Zusammenhang zwischen der Bildung von Antikörpern gegen REV und dem Vorliegen REV-Provirus-spezifischer DNA in PBMC**

Antikörper gegen REV	REV-Provirus-spezifische DNA in PBMC		Gesamt
	positiv	negativ	
<b>Positiv</b>	17 (53,1 %)	1 (3,1 %)	18
<b>Negativ</b>	3 (9,4 %)	11 (34,4 %)	14
<b>Gesamt</b>	20	12	32

Mit einer Ausnahme traten Antikörper gegen REV nur bei Tieren auf, bei denen auch REV-Provirus-spezifische DNA in PBMC nachgewiesen werden konnte. Umgekehrt wurde

nur bei drei Tieren, die keine Antikörper gegen REV hatten, REV–Provirus–spezifische DNA in den PBMC nachgewiesen (Tabelle 47).

Als Zusammenhangsmaß zwischen den nominalskalierten Variablen wurde Phi gewählt. Es betrug 0,748 ( $\alpha < 0,01$ ). Somit konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Antikörperbildung gegen REV und dem Nachweis von REV–Provirus–spezifischer DNA gezeigt werden.

#### 4.3.2 Vergleich der humoralen Immunantwort nach Infektion mit unterschiedlich hoch passagiertem Feldvirus

Das FPV–Feldisolat GB 869/02 (Nr. 11) wurde aus dem eingesandten Hautmaterial auf HEF isoliert und zunächst vier Mal auf diesem Zelltyp passagiert. Anschließend wurde es 32 Mal auf LMH passagiert. Die Ergebnisse der Untersuchung auf das Verhältnis zwischen FPV–DNA und REV proviraler DNA betrug in der vierten Passage auf LMH  $1:4,574 \cdot 10^{-4}$  (Tabelle 24).

Je 20 SPF–Küken wurden am ersten Lebenstag mit Zellkulturmaterial der vierten und 32. Passage auf LMH sowie des Impfstammes HP B, der einmal auf LMH passagiert worden war, intrakutan infiziert. Der Virusgehalt des zur Infektion verwendeten Zellkulturmaterials betrug bei allen Gruppen  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Zehn Tieren wurde als Negativkontrolle LMH–Zellkulturmaterial injiziert.

Um einen möglichen immunsuppressiven Effekt des REV festzustellen, wurden der Hälfte der Tiere jeder Gruppe zu Beginn des Versuches 0,2 ml 50%ige Schafserythrozytensuspension in die Brustmuskulatur injiziert.

Von allen Tieren wurde eine, zwei, drei und vier Wochen p. i. sowie bei der Tötung der Tiere fünf Wochen p. i. Blutproben genommen und das Plasma mittels Hämagglutination auf Antikörper gegen Schafserythrozyten sowie ab der zweiten Woche im ELISA gegen FPV und REV untersucht. Alle gestorbenen und nach fünf Wochen getöteten Tiere wurden sezziert.

**Tabelle 48: Versuchsgruppen im zweiten Infektionsversuch**

Gruppe	Anzahl Tiere	Virus	Passage	Virustiter	Infektion
I	20	869/02	4. LMH	$10^5$ TCID <sub>50</sub> /ml	intrakutan
II	20	869/02	32. LMH	$10^5$ TCID <sub>50</sub> /ml	intrakutan
III	20	HP–B	1. LMH	$10^5$ TCID <sub>50</sub> /ml	intrakutan
N	10	LMH–Zellkulturmaterial			0,1 ml intravenös

#### 4.3.2.1 Klinische Erscheinungen und Sektionen

Alle Tiere der infizierten Gruppen hatten eine Woche nach der intrakutanen Infektion eine Impfpocke. Zu keinem Zeitpunkt traten klinische Symptome einer FPV- oder REV-Erkrankung auf.

Insgesamt acht Tiere aus den Gruppen I, III und N starben während der gesamten Versuchsdauer aus verschiedenen Gründen wie Dottersackentzündung, katarrhalischer Enteritis, Peritonitis oder Kannibalismus. Die seziierten Tiere zeigten keine auf eine Pocken- oder REV-Erkrankung hindeutenden pathomorphologischen Veränderungen.

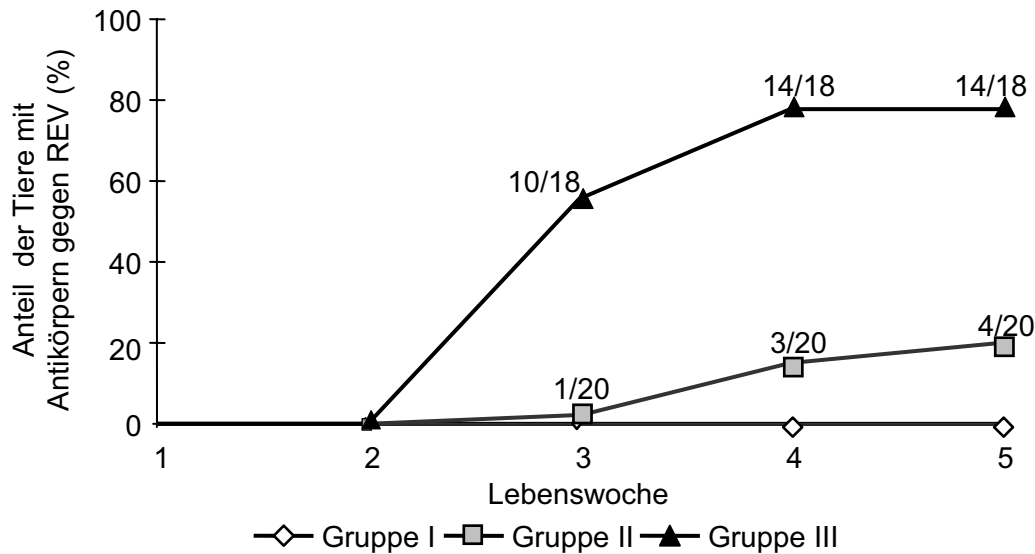
#### 4.3.2.2 Antikörperbildung gegen FPV

Zwei Tiere aus Gruppe I (4. LMH) hatten einen grenzwertigen FPV-Antikörper-Titer. In Gruppe II (32. LMH) entwickelten vier Tiere einen positiven und zwei weitere Tiere einen grenzwertigen FPV-Antikörper-Titer. 14 Tiere aus Gruppe III (HP B) entwickelten einen positiven FPV-Antikörper-Titer, alle anderen Tiere wiesen zumindest zu einem Untersuchungszeitpunkt einen grenzwertigen FPV-Antikörper-Titer auf (Tabelle 49, Abbildung 36). Kein Tier der Gruppe N wies während des gesamten Versuchszeitraum einen positiven oder grenzwertigen FPV-Antikörper-Titer auf.

**Tabelle 49: Ergebnisse der Untersuchung auf Antikörper gegen FPV in den Gruppen I (869/02, 4. LMH), II (869/02, 32. LMH) und III (HP B)**

Woche	Gruppe I (pos/gw/neg <sup>1</sup> )	Gruppe II (pos/gw/neg <sup>1</sup> )	Gruppe III (pos/gw/neg <sup>1</sup> )
2. Woche	0/0/19	0/0/18	0/0/19
3. Woche	0/1/16	1/1/18	10/6/2
4. Woche	0/2/15	3/3/14	14/3/1
5. Woche	0/1/14	4/0/16	14/3/1

<sup>1</sup>positive Plasmaproben/grenzwertige Plasmaproben/negative Plasmaproben



**Abbildung 36: Anteil der Tiere mit Antikörpern gegen FPV in den Gruppen I (4. LMH), II (32. LMH) und III (HP B); die Anzahl der positiven und der untersuchten Proben ist im Diagramm angegeben**

#### 4.3.2.3 Antikörperbildung gegen REV

Insgesamt acht Tiere aus Gruppe I (4. LMH) wiesen während des Versuchszeitraumes Antikörper gegen REV auf. Wegen des Verlustes eines seropositiven Tieres waren jedoch pro Untersuchungszeitpunkt maximal sieben Tiere positiv. Die beiden Tiere, die einen grenzwertigen FPV–Antikörper–Titer aufwiesen, waren REV–negativ.

Kein Tier der Gruppen II, III und N wies während des gesamten Versuchszeitraums einen positiven REV–Antikörper–Titer auf.

Die Ergebnisse sind aufgeschlüsselt nach dem Zeitpunkt der Untersuchung in Tabelle 49 wiedergegeben.

**Tabelle 50: Ergebnisse der Untersuchung auf Antikörper gegen REV in den Gruppen I (869/02, 4. LMH), II (869/02, 32. LMH) und III (HP B)**

Woche	Gruppe I (pos/neg <sup>1</sup> )	Gruppe II (pos/neg <sup>1</sup> )	Gruppe III (pos/neg <sup>1</sup> )
2. Woche	1/18	0/18	0/19
3. Woche	5/12	0/20	0/18
4. Woche	5/12	0/20	0/18
5. Woche	7/8	0/20	0/18

<sup>1</sup>positive Plasmaproben/negative Plasmaproben

#### 4.3.2.4 Antikörperbildung gegen Schafserythrozyten

Keines der Tiere entwickelte einen Antikörpertiter gegen Schafserythrozyten von höher als  $1:2^3$ , was als unspezifisch angesehen wurde. Eine Auswertung der Ergebnisse war somit nicht möglich.