

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig



**Aerogene Ausbreitung von Viren:
Eine Studie verschiedener Sammel-
geräte und Quantifizierungsmethoden zur
Virusisolierung aus der Luft**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Anika Friese
aus Borna

Leipzig, 2010

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen,
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig
2. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Böhm,
Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, Stuttgart

Tag der Verteidigung: 10.11.2009

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>iv</i>
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Bioaerosole in der Stallluft	3
2.2 Viren im luftgetragenen Zustand	5
2.2.1 Sammelmethode zum Nachweis von Viren aus der Luft	5
2.2.2 Untersuchungen an experimentell erzeugten Virusaerosolen	8
2.2.3 Untersuchungen an natürlich erzeugten Virusaerosolen	11
2.3 Quantitative Real-Time-PCR	15
2.3.1 Grundlagen der Real-Time-PCR	15
2.3.2 Fluoreszenzmarkierte Sonden	16
2.3.3 Auswertung der Real-Time-PCR	18
2.3.4 Quantifizierung mittels Real-Time-PCR	19
3 Tiere, Material und Methoden	22
3.1 Verwendete Zellkulturen	22
3.1.1 Kultivierung der Zellkulturen	22
3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen	23
3.2 Befruchtete Hühnereier	23
3.3 Verwendete Viren	23
3.3.1 Newcastle-Disease-Virus	23
3.3.2 Infektiöse-Bursitis-Virus	24
3.3.3 Felines Calicivirus	25
3.4 Untersuchungen an experimentell erzeugten Virus- aerosolen	26
3.4.1 Versuchsapparatur	26
3.4.2 Vorversuche zum Einfluss des Sammelmediums auf die Infektiösität der Viren und Nachweissysteme	27
3.4.3 Versuchsdurchführung	28
3.4.4 Quantitative Bestimmung des infektiösen Virus in Luftproben	31
3.4.5 Quantitative Bestimmung des Virusgenoms	32
3.4.6 Größenbestimmung der Partikel des erzeugten Virusaerosols	32
3.5 Quantitative Real-Time-PCR	34
3.5.1 Verwendete Primer und Sonden	34
3.5.2 Optimierung der Real-Time-PCR	35
3.5.3 Quantifizierung des Virusgenoms aus Luftproben	37
3.6 Aerogene Ausscheidung ausgewählter Impfviren unter experimentellen Bedingungen	41
3.6.1 Versuchstiere	41
3.6.2 Haltung der Versuchstiere	41

3.6.3	Versuchsaufbau	41
3.7	Aerogene Ausscheidung ausgewählter Impfviren in konventionellen Geflügelhaltungen	45
3.7.1	Infektiöse-Bursitis-Virus	45
3.7.2	Newcastle-Disease-Virus	45
3.8	Statistische Auswertung der Daten	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Optimierung der Real-Time-PCR	48
4.2	Untersuchungen an experimentell erzeugten Virus-aerosolen	50
4.2.1	Größenbestimmung der Partikel des erzeugten Virusaerosols	50
4.2.2	Einfluss des Sammelmediums auf den Nachweis von infektiösen Viren	50
4.2.3	Versuche mit dem Newcastle-Disease-Virus	52
4.2.4	Versuche mit dem Infektiösen-Bursitis-Virus	54
4.2.5	Vergleich der Nachweisraten beider Testviren	57
4.2.6	Nachweisgrenzen der Sammelgeräte für die Virusdetektion aus der Luft	58
4.3	Aerogene Ausscheidung ausgewählter Impfviren unter experimentellen Bedingungen	60
4.3.1	Impfung gegen Newcastle Disease	60
4.3.2	Impfung gegen Infektiöse Bursitis	62
4.4	Aerogene Ausscheidung ausgewählter Impfviren in konventionellen Geflügelhaltungen	63
4.4.1	Impfung gegen Newcastle Disease	63
4.4.2	Impfung gegen Infektiöse Bursitis	65
5	Diskussion	66
5.1	Untersuchungen an experimentell erzeugten Virus-aerosolen	66
5.1.1	Etablierung von Methoden zum quantitativen Virusnachweis aus Luftproben	66
5.1.2	Vergleich der Effizienzen der Sammelgeräte	68
5.1.3	Kritische Betrachtung der Versuchsanordnung	77
5.2	Untersuchungen an natürlich erzeugten Virusaerosolen	79
5.2.1	Newcastle-Disease-Virus	79
5.2.2	Infektiöse-Bursitis-Virus	82
5.3	Resümee	83
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
8	Literaturverzeichnis	89
	Anhang	98

Inhaltsverzeichnis

<i>Tabellenverzeichnis</i>	107
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	108
<i>Danksagung</i>	110

Abkürzungsverzeichnis

AB-Mix	Absolute™ QPCR Mix
Aqua dest	destilliertes Wasser
BBQ	BlackBerry Quencher
BGM	Buffalo green monkey
BHQ	BlackHole Quencher
BHV-1	Bovines Herpesvirus 1
°C	Grad Celcius
cDNA	Komplementär-DNA (<i>complementary dna</i>)
cpE	cytopathischer Effekt
CRFK	Crandell reese feline kidney
C _T	Threshold Cycle
Cy5	Cyanin
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribobukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EID	Ei-infektiöse Dosis (<i>egg infectious dose</i>)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EN	Europäische Norm
FAM	Fluorescein
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
HEX	Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein
IBD	Infektiöse Bursitis
IBDV	Infektiöse-Bursitis-Virus
ISO	Internationale Organisation für Normung
KbE	koloniebildende Einheiten
KSV	Klassisches Schweinepest Virus
log	Logarithmus, logarithmisch
M	molar
min	Minute
MKS	Maul-und Klauenseuche

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
ND	Newcastle Disease
NDV	Newcastle-Disease-Virus
<i>p. vacc.</i>	post vaccinationem
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFU	<i>plaque forming units</i>
PRRSV	Porcines Respiratorisches Reproduktives Syncytialvirus
quant.	quantitativ
RNA	Ribonukleinsäure
sog.	sogenannt
TAMRA	Tetramethylrhodamine
TCID	gewebeinfektiöse Dosis (<i>tissue culture infectious dose</i>)
U	Umdrehungen
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VP 1	Virusprotein 1
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

1 Einleitung

Die Übertragung von Infektionskrankheiten stellt ein sehr wichtiges Thema in der Medizin dar. Als Wegbereiter der modernen Mikrobiologie gilt Girolamo Fracastoro (1478 - 1558), der erstmals die Auffassung vertrat, dass Keime an der Übertragung von Krankheiten beteiligt sind. Er erklärte Arten und Ursachen der Ansteckung und erwähnte dabei auch die Luft als mögliche Infektionsquelle (GERABEK 2005). Später setzte sich FLÜGGE (1897) in zahlreichen Versuchen als einer der ersten sehr intensiv mit der Krankheitsübertragung speziell über die Luft auseinander. Mit der Einführung des festen Nähragars 1882 durch Robert Koch war die Sammlung von Luftkeimen durch einfache Sedimentation möglich. Und noch heute stellt die Isolierung von Mikroorganismen aus Aerosolen viele Wissenschaftler vor eine Herausforderung. Zu Bakterien und Pilzen gibt es diesbezüglich umfangreiche Untersuchungen. Nun sind es besonders auch die aerogen übertragbaren Viruserkrankungen, die in Vergangenheit und Gegenwart immer wieder gefährliche Ausbrüche verursachten. Bei der „Spanischen Grippe“ von 1918 z.B. handelte es sich um eine weltweite Pandemie durch Influenzaviren, welche 20 - 50 Millionen Todesopfer forderte (TUMPEY et al. 2005). Und auch aktuell besteht die Furcht vor einer pandemischen Ausbreitung von humanen Influenzaviren ausgehend von einer Epidemie in Mexiko.

Ebenso in der Tiermedizin haben verschiedene aerogen übertragbare Erkrankungen, wie Maul- und Klauenseuche (GLOSTER et al. 2007), Aujeszky-Disease (MACK et al. 1986), Klassische Schweinepest (WEESENDORP et al. 2008), Aviäre Influenza (ALEXANDER 2008a) oder Newcastle Disease (LI et al. 2008) große Bedeutung erlangt. Allein in den vergangenen drei Jahren ist durch das Auftreten der klassischen Geflügelpest in Deutschland ein wirtschaftlicher Schaden von mehreren Millionen Euro entstanden. Hinzu kommen die Schäden aus ethischer und tierschützerischer Sicht durch die vorgeschriebenen Anordnungen zahlreicher Massentötungen tierseuchengefährdeter Nutztiere.

Bisher gibt es keine genauen Untersuchungen zur Ausbreitung von Viren in Nutztierställen sowie in deren Umgebung. Das liegt vor allem an der schwierigen Sammel- und Nachweismethodik dieser Erreger aus der Luft. In der vorliegenden Dissertationsschrift werden Sammelgeräte hinsichtlich ihrer Effektivität zur Virusisolierung aus Aerosolen verglichen. Verschiedene Methoden zur Quantifizierung der gesammelten Viren werden etabliert und auf ihre Effizienz in Kombination mit den unterschiedlichen Sammelgeräten geprüft. Diese Ergebnisse sollen Grundlage für weiterführende Untersuchungen unter praktischen Bedingungen sein. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene erste Versuche in Geflügelställen durchgeführt. Es erfolgten lufthygienische Untersuchungen, sowohl in Experimentalställen als auch in konventionellen Tierstallungen, nach der Vakzinierung von Geflügel mit verschiedenen Lebendimpfstoffen.

Einleitung

Diese Arbeit soll einen Beitrag zu der grundlegenden Fragestellung der Effizienz verschiedener Sammelgeräte in Kombination mit unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden zur Virusisolierung aus Luftproben leisten.

2 Literaturübersicht

2.1 Bioaerosole in der Stallluft

Ein Aerosol wird als „feindisperses System, das aus einem Gas [...] und festen oder flüssigen Schwebeteilchen [...] besteht“, definiert (WIESNER u. RIBBECK 2000). Unter Bioaerosolen versteht man Aerosole mit Partikeln biologischen Ursprungs bzw. mit biologischer Aktivität, welche Lebewesen beispielsweise durch infektiöse, allergene, pharmakologische oder toxische Prozesse beeinflussen können (HIRST 1995). Dabei spielt die Größenordnung dieser Partikel eine wesentliche Rolle. Partikel mit einer Größe von 10 - 20 µm werden im Nasen-Rachen-Raum abgefangen, mit einer Größe von 5 - 10 µm im zentralen Bronchialbaum und Teilchen mit einer Größe von 1 - 5 µm gelangen bis zu den Alveolen. Die kleinste Fraktion besitzt dabei die größte gesundheitliche Bedeutung (HARTUNG 1998). SEEDORF u. HARTUNG (2002) stellten fest, dass bis zu 99 % eines Bioaerosols aus Partikeln kleiner 10 µm bestehen. Dabei unterscheidet man die biologische und physikalische Stabilität eines Aerosols (JARNYCH 1976). Unter biologischer Stabilität versteht man die Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit und Virulenz der im Aerosol befindlichen Mikroorganismen. Die physikalische Stabilität meint die Veränderung des Aerosols z.B. durch Absinken bzw. Sedimentation der Teilchen oder Kondensation von Flüssigkeit. In der Luft von Tierställen kommt eine Vielzahl von Stoffen vor, die als Mischung Bioaerosole bilden können: Gase, Staub, Bakterien, Pilze, Viren, Endotoxine oder auch Medikamentenreste wie Antibiotika und Desinfektionsmittel (SEEDORF u. HARTUNG 2002, HAMSCHEER et al. 2003). Für die Mikroorganismen dient die Luft dabei hauptsächlich als Transportmedium, da sie keinerlei Nährstoffe für Wachstum und Vermehrung dieser enthält.

Staub: Gemäß der international anerkannten Norm EN 481 (ISO 7708) wird hier in einatembarer (E-Staub) und alveolengängigen Staub (A-Staub) unterschieden. Einatembarer Staub ist die Gesamtheit der Partikel in der Atemluft, die durch Mund und Nase eingeatmet werden können. Alveolengängiger Staub sind die Partikel, die bis zu den Alveolen vordringen. Dabei spielt vor allem der aerodynamische Durchmesser der Partikel die entscheidende Rolle. Der Großteil des Staubes stammt laut PEARSON u. SHARPLES (1995) vom Futter. Daneben kann dieser auch vom Einstreu, getrocknetem Kot- bzw. Harnmaterial oder den Tieren selbst, in Form von Federn, Haaren, Schmutz oder Hautschuppen stammen (AENGST 1984). An dem Staub sind oft potentielle Krankheitserreger, wie Bakterien, Pilze, parasitäre Dauerformen, aber auch Viren adsorbiert (LUTZ et al. 1984). Der Staub stellt somit ein Vektor für verschiedenste Krankheitserreger, sowohl für die Tiere als auch für das Stallpersonal, dar (HARTUNG u. WHYTE 1994, ZUCKER u. MÜLLER 2000). Auch bei der Geflügelhaltung gehen fortwährend Partikel in die Stallluft über, so KÖSTERS (1984). ELLEN et al. (2000) gibt die Gesamtstaubbelastung in Geflügelställen mit 0,02 - 81,33 mg / m³ und die Feinstaubbelastung über den gro-

Ben Bereich von 0,01 - 6,5 mg / m³ Luft an. Dabei erwies sich die Staubbelastung in der Käfighaltung von Legehennen am geringsten.

Mikroorganismen: Zu den in der Luft vorkommenden Mikroorganismen gehören Bakterien, Pilze, Hefen und Viren (HILLIGER 1991). ZUCKER et al. (2000) gibt an, dass bis zu 5 % der Mikroorganismen in der Stallluft aus gramnegativen Organismen bestehen und der überwiegende Anteil aus grampositiven Bakterien, wobei keine Erfassung der Viren erfolgte. Die

Mikroorganismen kommen vor allem an Staub gebunden, zum Teil jedoch auch freischwebend, vor (HARTUNG 1986). Quelle stellen die Tiere selbst (Exkrete, Haut, Federn) sowie Futter und Einstreu (HARTUNG u. WHYTE 1994) dar. Nach LUTZ et al. (1984) und MÜLLER u. WIESER (1987) können auch bereits sedimentierte Organismen erneut in den Schwebzustand übergehen. Dieser Vorgang wird „reentrainment“ genannt. Zum Vorkommen von Bakterien und Pilzen in der Stallluft sind schon zahlreiche Studien durchgeführt wurden. So wurde z.B. in Untersuchungen von ZUCKER u. MÜLLER (2000) ein Gehalt an aeroben Organismen von 2.143 – 26.069 KbE / m³ Luft ermittelt. Zum Vorkommen und der Quantifizierung von Viren in der Stallluft jedoch, liegen durch die schwierigere Sammel- und Nachweismethodik weit weniger Daten vor. Auf diese spezielle Thematik wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Endotoxine: Die Endotoxine in der Stallluft sind genau wie die Mikroorganismen meist an Staub gebunden. Dabei handelt es sich um Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien, genauer um die Lipopolysaccharide. Sie haben eine große Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse und können so ihre Wirksamkeit über Jahre hinweg aufrechterhalten (HARTUNG 1998, ZUCKER u. MÜLLER 2004). Beim Vergleich des Endotoxingehalts in der Stallluft konnten in Hühnerhaltungen die höchsten Konzentrationen festgestellt werden, nachgefolgt von Schweine- und Rinderhaltungen (HARTUNG u. SEEDORF 1999).

Andere Bestandteile eines Bioaerosols: Es können auch andere Stoffe mit biologischer Wirkung wie Antibiotika oder Desinfektionsmittel ebenfalls, vor allem an Staub gebunden, in der Stallluft vorkommen (HAMSCHEER et al. 2003). Auch hierzu gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Weiterhin befinden sich meist verschiedenste Gase in einem Bioaerosol. Dabei handelt es sich hauptsächlich um die bekannten Schadgase wie Ammoniak, Schwefelwasserstoff, Kohlendioxid, Distickstoffoxid oder Methan (HARTUNG 1992). Ammoniak mit seiner reizenden Wirkung sowie dem toxischen Schwefelwasserstoff kommen dabei die größte Bedeutung hinsichtlich einer gesundheitlichen Gefährdung zu (HARTUNG u. WHYTE 1994).

2.2 Viren im luftgetragenen Zustand

2.2.1 Sammelmethoden zum Nachweis von Viren aus der Luft

Prinzipiell können die Sammelmethoden zum Nachweis von Bakterien oder Pilzsporen aus der Luft auch für luftgetragene Viren angewendet werden. Im Gegensatz zu den zahlreich in Luftproben untersuchten Bakterien und Pilzen, gibt es bisher zur Virussammlung aus der Luft jedoch keine allgemeingültigen, standardisierten Protokolle (GRINSHPUN et al. 2007).

2.2.1.1 Sedimentation

Die Sedimentation stellt das älteste und einfachste Verfahren der Luftkeimsammlung dar. Diese Methode beruht auf dem passiven Absetzen der Mikroorganismen und Staubpartikel auf ein mit Auffangmedium befülltes, offenes Gefäß, meist eine Petrischale (GRINSHPUN et al. 2007). Das Verfahren wird überwiegend zum Nachweis luftgetragener Bakterien genutzt und ist zur Sammlung von Viren weniger geeignet. Die Viren müssen in sehr hohen Konzentrationen vorkommen, damit eine Isolierung möglich ist. Da kein definiertes Luftvolumen beprobt werden kann, sind quantitative Aussagen über die Keimbelastung der Luft zudem nicht möglich. Im direkten Vergleich mit anderen Keimsammelmethoden, welche mit definierten Luftvolumina arbeiten, stimmt weder die qualitative noch die quantitative Aussage über den Luftkeimgehalt gut überein (BUTTNER u. STETZENBACH 1993, SAYER et al. 1972). Größere Partikel sedimentieren schneller und werden somit bevorzugt erfasst. Viren sedimentieren, wenn sie nicht an Partikel adsorbiert sind, durch ihre geringe Größe also wesentlich weniger. Außerdem ist diese Methode stark von der Luftbewegung beeinflusst (BURGE u. SOLOMON 1987). Dennoch gelang es BOURGUEIL et al. (1992a) Porcines Respiratorisches Coronavirus mit Hilfe der Sedimentationsmethode im Tierstall zu isolieren. Sie benutzten eine mit Sammelmedium befüllte Petrischale, welche für eine Stunde im Stall aufgestellt wurde.

2.2.1.2 Impingement

Das Impingement („Auswaschung“) ist die Methode, welche am häufigsten zur Sammlung von luftgetragenen Viren angewendet wird (SPENDLOVE u. FANNIN 1982, STOLZE u. KAADEN 1989). Beim Impingement werden in der Luft enthaltene Partikel in eine Sammel-flüssigkeit abgeschieden. Ein definiertes Luftvolumen wird mit hoher Geschwindigkeit über eine Kapillare („kritische Düse“) durch die Sammel-flüssigkeit geleitet. Durch Trägheit und Dif-fusion gehen die Partikel in die flüssige Phase über.

Das bekannteste Gerät mit häufiger Verwendung ist der All-Glass-Impinger-30 (AGI-30). Dieser wird neben dem Andersen-Sammler als sog. Referenzsammler eingesetzt. Zudem gibt es noch weitere modifizierte Geräte, wie beispielsweise der Pre-Impinger (MAY u. DRUETT

1953), Bulged All-Glass-Impinger (TYLER u. SHIPE 1959) oder der Shipe-Sammler (SHIPE et al. 1959). Für die Sammlung von Viren mit Hilfe eines Impingers ist das Sammelmedium von großer Bedeutung. Dieses sollte so beschaffen sein, dass die isolierten Viren vor einer Inaktivierung geschützt werden. Außerdem darf es nicht toxisch auf die verwendeten Zellkulturen wirken sowie keine inhibitorische Wirkung für den molekularbiologischen Nachweis besitzen. Einfache Sammelflüssigkeit wie destilliertes Wasser ist für die meisten Viren ungeeignet (AGRANOVSKI et al. 2004). Häufig werden Salze oder Proteine, wie bovines Serumalbumin oder fetales Kälberserum, zur Hemmung der Virusinaktivierung beigelegt. Besonders behüllte Viren sollen dadurch vor der Inaktivierung geschützt werden und können somit auch nach der Probenentnahme länger bis zur Analyse aufbewahrt werden (STOLZE u. KAADEN 1989). Zudem kommen Schaumhemmer zum Einsatz, welche die massive Schaumbildung beim Sammelprozess mit proteinhaltigen Sammelflüssigkeiten verhindern sollen (IJAZ et al. 1987, SCHOENBAUM et al. 1990). Dabei werden kommerziell erhältliche Schaumhemmer, wie Antifoam A, verwendet, aber auch Olivenöl (MAYHEW et al. 1968, MAYR 2002). Außerdem können adsorbierende Substanzen zur Vermeidung des „reentrainments“, das ist der erneute Übergang von schon gesammelten Partikeln in den luftgetragenen Zustand, verwendet werden (BAYEVA LYE et al. 1990). Die Hinzugabe von Ethylenglycol zum Sammelmedium ermöglicht eine Virussammlung unter 0 °C. HERMANN et al. (2006) untersuchte die oben aufgezählten Komponenten und deren Auswirkung auf die Infektiosität der Testviren (Porcines Respiratorisches Reproduktives Syncytialvirus, Swine Influenza Virus), die Zellkultur sowie die PCR. Dabei konnten mit einem Sammelmedium aus PBS und Ethylenglycol die besten Resultate zum Nachweis von PRRSV aus dem Virusaerosol erzielt werden. Schaumhemmer, Proteine und Ethylenglycol waren teilweise zelltoxisch, hatten jedoch keinen Einfluss auf die Infektiosität der Viren. Die PCR wurde von adsorbierenden Substanzen, wie aktivierten Carbonaten und Proteinen nachteilig beeinflusst. ADAMS et al. (1982) z.B. stellte mit Minimal Essential Medium und 1 % Schaumhemmer (Silikonöl) als Impingersammelflüssigkeit die höchsten Wiederfindungsraten für das Reovirus fest und HERMANN et al. (2007) benutzten nur phosphatgepufferte Lösung (PBS) zur Sammlung von PRRSV.

Auch die Sammelzeit beeinflusst den Virusnachweis, da es bei sehr langer Laufzeit zu einer Verdunstung der Sammelflüssigkeit oder „reentrainment“ und damit zu einer Verfälschung der Viruskonzentration in der Flüssigkeit kommen kann (HOGAN et al. 2005, SATTAR u. IJAZ 2007). Außerdem kann durch Verdunstung der Flüssigkeitspegel im Impinger so stark absinken, dass die angesaugte Luft nicht mehr durch die Sammelflüssigkeit geleitet wird und folglich keine Viren mehr in der flüssigen Phase abgeschieden werden können.

Die genauen Bedingungen der Virussammlung sollten daher für den speziellen Erreger individuell untersucht und festgelegt werden (HERMANN et al. 2006).

2.2.1.3 Filtration

Bei der Filtration wird ein definiertes Luftvolumen durch einen Filter gesaugt. Die Partikel werden durch Trägheitsabscheidung, Diffusion, Adsorption oder elektrostatische Anziehung auf dem Filter abgelagert (GRINSHPUN et al. 2007). Es gibt Membranfilter (syn. Oberflächenfilter), z.B. aus Polycarbonat oder Polyamid, von welchen im Anschluss an eine Sammlung die adsorbierten Partikel abgewaschen und in eine Lösung überführt werden. Mit dieser Lösung werden dann alle weiteren Untersuchungen durchgeführt. Eine andere Filterart ist der Tiefenfilter, der eine in die Tiefe vernetzte Struktur zum besseren Auffangen der Partikel aus der Luft besitzt. Als Material der Tiefenfilter kommen Gelatine, Cellulose oder Glasfasern zum Einsatz. Nach einer Luftprobenentnahme werden diese Filter komplett in Lösung gebracht. Damit wird sichergestellt, dass alle eingefangenen Partikel auch zur Auswertung kommen. Somit ist ein quantitativer Nachweis der Mikroorganismen aus einer Probe möglich (TSENG u. LI 2005, WEESENDORP et al. 2008). Bei den Membranfiltern hingegen ist es möglich, dass nicht alle Partikel abgewaschen werden. Eine Virusquantifizierung könnte daher sehr ungenau sein. Zur Verhinderung einer Austrocknung der Viruspartikel werden die Filter nach der Sammlung häufig mit einer Flüssigkeit versetzt und so bis zur Weiterverarbeitung gelagert (JASCHOF 1992a). Ein häufig verwendetes Gerät ist der mobile AirPort[®] MD8 (Sartorius AG, Göttingen), welches für die verschiedenen Filtertypen kompatibel ist.

2.2.1.4 Impaktion

Die Methode der Impaktion („Einschlag“) beruht auf der Beschleunigung des Luftstroms und dessen Richtungsänderung. Die in der Luft enthaltenen Partikel können auf Grund ihrer Trägheit dieser Richtungsänderung nicht folgen und werden auf einem Sammelmedium abgeschieden. Durch Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit können die Partikel zudem ihrer Größe bzw. Masse nach sortiert werden. Ein bekanntes Sammelgerät, welches die größenabhängige Impaktion benutzt, ist der 6-stufige Andersen-Kaskaden-Impaktor (ANDERSEN 1958). Dabei wird die Luft durch Lochplatten mit immer kleineren Perforationen geleitet und dadurch beschleunigt. Hinter jeder Lochplatte befindet sich eine Agarplatte, durch welche die Luft zur Seite abgeleitet wird und worauf die entsprechend größeren und dadurch trägeren Partikel abgeschieden werden. Eine Sammlung der Teilchen ihrer Größe nach ist dadurch möglich.

Ein Virusnachweis aus der Luft ist mittels Impaktion prinzipiell auch möglich. Anstatt herkömmlichen Agarplatten muss ein Sammelmedium verwendet werden, welches eine anschließende Virusisolierung ermöglicht. So benutzte IJAZ et al. (1987) als Medium Tryptose-Phosphat-Bouillon mit 3 % Gelatine, womit nach dessen Auflösung vernebelte Rotaviren nachgewiesen werden konnten. Zur Detektion von Newcastle-Disease-Virus aus einer Aerosolkam-

mer beschichtete HUGH-JONES et al. (1973) Glasplatten mit 5 % Gelatine in 10 %-igem Glycerin.

Bei der zentrifugalen Impaktion werden die Partikel aus der Luft durch die wirkenden Zentrifugalkräfte abgeschieden. Oft verwendet wird der Reuter-Centrifugal-Sammler (RCS). Dabei werden Agarstreifen ringförmig in den rotierenden Sammelkopf eingelegt.

Auch die sog. Zyklone gehören zu den Zentrifugalsammlern. Hierbei wird die Zuluft mit einer definierten Menge an Sammelflüssigkeit gemischt, dann in einen zylindrischen Raum eingesaugt und rotiert. Die Gefäßwände beschlagen und in der Luft befindliche Partikel werden an ihnen abgeschieden. Dadurch können die gesammelten Partikel sehr gut konzentriert werden. BOURGUEIL et al. (1992b) und BOURGUEIL et al. (1992a) gelang es mit dieser Methode Aujeszky-Virus und Coronavirus in Stallungen nachzuweisen. Jedoch konnten sie in den Proben nur eine geringe Virusmenge von maximal $10^{1,84}$ PFU / m³ nachweisen. In Untersuchungen von AMARAL DOEL et al. (2009) erwies sich der Zyklon-Sammler im Vergleich mit anderen Sammlern als das effizienteste Gerät.

2.2.1.5 Elektropräzipitation

Bei der Elektropräzipitation wird die Luft in ein Hochspannungsfeld geleitet, in welchem die Aerosolpartikel elektrisch aufgeladen werden. Anschließend prallen die Partikel auf eine entgegengesetzt geladene Sammelscheibe, die permanent von einer Sammelflüssigkeit umspült wird (MAINELIS 2002). Diese Methode wird auch häufig zur Virusisolierung angewandt. Durch die sehr hohen Luftdurchsatzraten ist sie auch bei geringer Viruskonzentration in der Luft geeignet. Ein bekanntes Sammelgerät ist der Litton Large Volume Air Sampler (LVS). HUGH-JONES et al. (1973) gelang es auf diese Weise Newcastle-Disease-Virus in der Stall- und Außenluft von Tierställen zu isolieren. Auch MKS-Viren (SELLERS u. HERNIMAN 1972, SELLERS u. PARKER 1969, DONALDSON et al. 1970) und Aujeszky-Virus (MACK et al. 1986) wurden mit Hilfe der Elektropräzipitation nachgewiesen.

2.2.2 Untersuchungen an experimentell erzeugten Virus aerosolen

An experimentell erzeugten Virus aerosolen werden viele Untersuchungen zu luftgetragenen Viren durchgeführt. Damit ist es möglich verschiedene Bedingungen, welchen Viren in der Luft ausgesetzt sein können, experimentell zu simulieren und so deren Auswirkung zu untersuchen. Prinzipiell kann jedes Virus, welches im künstlich erzeugten Aerosol stabil bleibt, aerogen übertragen werden (SATTAR u. IJAZ 2007). Zudem können verschiedene Sammelmethode am gleichen Virus aerosol getestet und verglichen werden. Die Größe der Partikel eines generierten Virus aerosols sollte unter 5 µm liegen, damit sich die Teilchen im Schwebestand befinden

(SATTAR u. IJAZ 2007). Diese Teilchengröße lässt sich mit optischen Methoden (WEESENDORP et al. 2008) bestimmen oder auch mit Hilfe des Andersen-Kaskaden-Sammlers (GUERIN u. MITCHELL 1964, IJAZ et al. 1987).

Der Einfluss von **Temperatur und Luftfeuchtigkeit** auf das Virusaerosol wurde besonders ausführlich untersucht. MOHR (2007) beschreibt, dass die relative Luftfeuchtigkeit direkt die Größe, Form und Dichte der vernebelten Partikel beeinflusst und somit auch die Sammeleffizienz der Geräte. Dazu im Widerspruch steht eine Studie von IJAZ et al. (1987), worin keine Unterschiede der Partikelgröße in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit festgestellt wurden. HERMANN et al. (2007) berichtet von der Herabsetzung der Aerosolstabilität durch hohe Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten. Gerade diese beiden Faktoren beeinflussen die biologische Stabilität von Mikroorganismen, Viren eingeschlossen (COX 1989). Behüllte Viren besitzen meist eine höhere Stabilität bei niedrigen Luftfeuchtigkeiten, Viren ohne Hülle bei hohen Luftfeuchtigkeiten (BENBOUGH 1971, MOHR 2007). DONALDSON u. FERRIS (1976) stellte auch eine hohe Stabilität der unbehüllten Caliciviren bei hohen Luftfeuchtigkeiten fest. IJAZ et al. (1987) und IJAZ et al. (1994) konnten zeigen, dass sowohl das unbehüllte Rotavirus als auch das behüllte Coronavirus bei einer mittleren Luftfeuchtigkeit am stabilsten waren. Bezüglich Polio- und Rhinovirus, beide unbehüllt, bestätigte sich die allgemeine Annahme, wonach sie bei einer hohen Luftfeuchtigkeit am stabilsten sind. Experimente mit dem Newcastle-Disease-Virus (NDV, Stamm LaSota) zeigten, dass diese behüllten Viren bei niedriger Luftfeuchtigkeit ihre höchste Stabilität besitzen (SATTAR u. IJAZ 2007). Im Kontrast dazu steht eine Studie von HUGH-JONES et al. (1973), in der verschiedene Wildtypen des NDV bei höheren Luftfeuchtigkeiten stabiler blieben. Eine generelle Aussage über die Virusstabilität in Abhängigkeit von der Luftfeuchte ist also nicht möglich, da es offenbar auch innerhalb einer Virusfamilie zu unterschiedlichen Reaktionen auf verschiedene Luftfeuchtigkeiten kommt (HYSLOP 1971). So stellten MITCHELL u. GUERIN (1972) fest, dass luftgetragene aviäre und equine Influenzaviren stabiler als humane und porcine sind. Zudem beeinflusst die Flüssigkeit, in der das zu vernebelnde Virus gelöst ist, die Reaktion auf die unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten sowie die Stabilität der Viruspartikel generell (HARPER 1963, LUTZ et al. 1984, BENBOUGH 1971).

Zusätzlich hat die Temperatur einen sehr großen Einfluss. Die Detektionsraten der verschiedenen Viren sind bei niedrigen Temperaturen wesentlich besser (SCHOENBAUM et al. 1990, HERMANN et al. 2007). So verliert auch das Newcastle-Disease-Virus bei hohen Temperaturen leichter seine Infektiosität (LANDMAN u. VAN ECK 2001).

Von großer Bedeutung bezüglich der Stabilität eines Aerosols in einer Kammer ist dessen **physikalische Stabilität**. Diese Sedimentation wird vor allem durch die Partikelgröße beeinflusst (STÄRK 1999). Die physikalischen Verluste wurden in verschiedenen Studien untersucht, wobei Marker wie z.B. Rhodamine in die Virussuspension hinzu gegeben wurden oder radioaktiv markierte Viruspartikel verwendet wurden. IJAZ et al. (1987) und HERMANN et al. (2007) zeigten, dass der Marker sofort nach der Vernebelung zu ca. 100 % wieder gefunden werden konnte und die Detektion im Verlauf der Zeit absinkt. In beiden Studien stimmte der Abfall der Markerkonzentration mit dem Absinken der Viruskonzentration im Aerosol gut überein. Man unterscheidet Aerosolkammern, in denen das erzeugte Virusaerosol bewegungslos verharrt (statisches Aerosol) und solche, in denen das Aerosol ständig in Bewegung gehalten wird (dynamisches Aerosol). Dadurch wird das Aerosol vor der Sedimentation bewahrt und kann besser studiert werden (JARNYCH 1976, GOLDBERG et al. 1958, IJAZ et al. 1987).

Die **Effizienzen** der verschiedenen Geräte zur Sammlung luftgetragener Viren war zudem auch Gegenstand einiger Untersuchungen. In den 60er Jahren wurde ermittelt, dass die Effizienz von Impingern zum Nachweis von infektiösem Virus höher als die von Filtern ist (HATCH u. WARREN 1969). Im Allgemeinen wurden die Effizienzen für den Nachweis von infektiösem Virus bestimmt, nicht von Virusgenom mittels PCR (STOLZE u. KAADEN 1989, TSENG u. LI 2005, HOGAN et al. 2005). Dabei hängt die Effizienz der Geräte prinzipiell stark von der Virusmorphologie sowie der relativen Luftfeuchtigkeit ab (TSENG u. LI 2005). Diese Autoren verglichen die Sammeleffizienzen vier verschiedener Sammelgeräte und kamen zu dem Ergebnis, dass die Effizienzen des AGI-30, des Andersen-Impaktors und des Gelatinefilters signifikant höher waren als die eines Polycarbonatfilters. Sie schätzten aber vor allem die Bedingungen der Probenaufbewahrung bis zur Analyse als entscheidendes Kriterium für den Erhalt der Virusinfektiosität und somit der Geräteeffizienz ein. AGRANOVSKI (2005) sammelte Influenza-Virus und Vaccinia-Virus aus einem generierten Aerosol mit Hilfe eines neuen „personal samplers“, welcher auf dem Prinzip des Impingements beruht. Die Wiederfindungsrate für Influenza-Virus lag bei ca. 20 %, die für das robustere Vaccinia-Virus bei 80 %. PYANKOV et al. (2007) bestätigten die Ergebnisse bezüglich des Influenza-Virus. Zu anderen Ergebnissen führten Studien von HOGAN et al. (2005), in denen für die Sammlung von Partikeln mit einer Größe von 30 - 100 nm eine Effizienz von weniger als 10 % mit verschiedenen Impingern nachgewiesen werden konnte. Außerdem verringerte sich die Effizienz mit Erhöhung der Laufzeit der Geräte.

Im Vergleich drei verschiedener Filter zur Sammlung von MS 2-Virionen ermittelten BURTON et al. (2007) Detektionsraten von über 96 % mit Gelatine- und PTFE (Polytetrafluoroethylen)-Filtern sowie von 27 - 68 % mit Polycarbonatfiltern. Dabei handelte es sich al-

lerdings genau genommen nur um das Rückhaltevermögen der Filter, da die physikalische Partikelanzahl in der Luft vor und nach dem Passieren des Filters gemessen wurde und so keine Aussage über die Infektiosität der Viren gemacht werden kann. Bei Versuchen mit Newcastle-Disease-Virus und Nitrozellulosefiltern zu dessen Detektion traten große anfängliche Verlust nach Vernebelung der Virussuspension auf. Es wurde weniger als 1 % an infektiösen Viren wieder gefunden (LANDMAN u. VAN ECK 2001).

Seit ca. 20 Jahren ist die Genomdetektion mit Hilfe der **Polymerasekettenreaktion** (PCR) möglich, welche auch für den Virusnachweis aus Luftproben genutzt wird (PYANKOV et al. 2007, DEE et al. 2005, WEESENDORP et al. 2008). Mit Hilfe dieser Methode kann das gesuchte Virus sehr spezifisch aus der meist noch mit anderen Mikroorganismen kontaminierten Luft nachgewiesen werden. Ein weiterer Vorteil ist die Schnelligkeit der PCR. Bei Detektion des spezifischen Pathogens können anschließend die meist zeitaufwendigeren Analysen zur Ermittlung von infektiösem Virus erfolgen. Bei negativem PCR - Ergebnis blieben diese erspart (PYANKOV et al. 2007). Dazu können die Mikroorganismen, welche schwer kultivierbar sind oder ihre Infektiosität verloren haben, immer noch im Aerosol detektiert (STÄRK 1999) und auch quantifiziert werden. DEE et al. (2005), HERMANN et al. (2006) und CHO et al. (2006) wiesen das Genom des PRRS-Virus in Luftproben mittels quantitativer PCR nach. Auch WEESENDORP et al. (2008) verwendeten die Real-Time-PCR zum quantitativen Nachweis des klassischen Schweinepest-Virus in Luftproben. Eine für das MKS-Virus von QUAN et al. (2004) entwickelte quantitative Real-Time-PCR, die eine Quantifizierung mittels Standardkurve ausführt, wurde in verschiedenen Aerosolexperimenten angewandt (AMARAL DOEL et al. 2009, RYAN et al. 2009). Auf die Hintergründe der Quantifizierung mit Hilfe der Real-Time-PCR wird in Kapitel 2.3.4 genauer eingegangen.

Insgesamt sind die durchgeführten Studien schwierig zu vergleichen, da verschiedene Sammelmethoden und -zeiten, Luftdurchflussraten sowie unterschiedliche Analysemethoden angewandt werden (GRINSHPUN et al. 2007).

2.2.3 Untersuchungen an natürlich erzeugten Virusaerosolen

Viren können aus virushaltigem, festen oder flüssigen Material (z.B. aus Kot oder Urin) in den luftgetragenen Zustand übergehen oder auch direkt (z.B. beim Niesen oder Husten) in die Luft abgegeben werden (SATTAR u. IJAZ 1987). Im Allgemeinen hängt die Aerosolproduktion auch von dem Grad der Tieraktivität ab, so dass bei besonders starker Aktivität vermehrt Aerosol produziert wird (STÄRK 1999, GLOSTER et al. 2007). Dies hatte in der Studie von

GLOSTER et al. (2007) allerdings keine vermehrte Virusproduktion zu Folge. Die in der Luft befindlichen viralen Erreger können anschließend sowohl innerhalb von Räumen (GOLDMANN 2000) als auch im Außenbereich weiter verbreitet werden (CHRISTENSEN et al. 1993).

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass viele Viruserkrankungen der Tiere aerogen übertragen werden (SATTAR u. IJAZ 1987) und weitere Ausbrüche durch Verfrachtung der Erreger mit dem Wind hervorgerufen werden können (GLOSTER et al. 2003, CHRISTENSEN et al. 1993, DONALDSON u. ALEXANDERSEN 2002). Wie lange ein Virus in der Luft infektiös bleiben kann, hängt von vielen Faktoren ab.

Zum einen sind physikalische Umweltfaktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Strahlung und Gase wichtig, zum anderen die Virusbeschaffenheit an sich und das Material, in welchem sich das Virus vor dem Übergang in die Luft befand (BENBOUGH 1971, SATTAR u. IJAZ 1987). Zum Beispiel untersuchten SELLERS u. HERNIMAN (1972) den Einfluss von Regen auf die aerogene Virusübertragung anhand des MKS-Virus. Sie stellten fest, dass nur sehr starker Regen zu einer Herabsetzung des Virustiters in der Luft führen würde, indem sich Tröpfchen $> 6 \mu\text{m}$ vermehrt absetzen würden. In der Tiermedizin gibt es einige Untersuchungen zu luftgetragenen Viren, ihre Fähigkeit zur Infektion des Wirtes sowie ihre aerogene Ausscheidung durch das Tier. Viele Studien zu Infektionsversuchen von Tieren mit experimentell erzeugten Aerosolen wurden durchgeführt, um eine potentielle Infektion einer bestimmten Krankheit über die Luft nachzuweisen (FRANK et al. 1977, WILKINSON et al. 1977, RATANASETHAKUL u. CUMMING 1983). Auf Untersuchungen zu dem in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden Virusnachweis aus Luftproben soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Vor allem die aerogene Virusübertragung des MKS-Virus wurde umfangreich untersucht. So konnten schon SELLERS u. PARKER (1969) sowie DONALDSON et al. (1970) mittels Impingement Virus in der Stallluft von infizierten Schweinen, Schafen und Rindern nachweisen (wobei Schweine die höchsten Viruskonzentrationen in der Luft verursachten). SELLERS u. HERNIMAN (1972) gelang sogar die Virusdetektion in der Stallluft von infizierten Schweinen, nachdem diese den Stall verlassen hatten. Später belegten DONALDSON et al. (1982) eine Virusdosis von $10^{8,6}$ TCID₅₀ und GLOSTER et al. (2007) von maximal $10^{6,3}$ TCID₅₀, die ein infiziertes Schwein pro Tag in die Luft abgibt. Diese abgegebene Virusmenge ist zum einen von der Infektionsdosis und zum anderen vom Infektionsstamm abhängig. Tiere, die mit einer niedrigeren Infektionsdosis infiziert worden sind, schieden zwar später Virusaerosol aus, jedoch insgesamt mehr Viruspartikel (GLOSTER et al. 2008). Der Virusstamm beeinflusst zudem die aerogene Übertragung. So konnten die Wissenschaftler in einer Studie von VALARCHER et al. (2008) zwar das MKS-Virus in der Stallluft von infizierten Schafen nachweisen, eine aerogene Übertragung der Krankheit auf gesunde Schafe, wie es bei GIBSON u. DONALDSON (1986)

zum Teil möglich war, fand jedoch nicht statt. Durch Entwicklung moderner Sammelgeräte wurde die Isolierung von MKS - Virus aus der Luft unter Feldbedingungen weiter verbessert (RYAN et al. 2009).

Weiterhin wurden noch andere Viruserkrankungen der Schweine auf ihr Vorkommen in der Luft untersucht. Schon vor über 30 Jahren wiesen SELLERS u. HERNIMAN (1974) das Virus der Vesiculären Schweinekrankheit in der Luft von infizierten Tieren mit Hilfe eines Impingers nach. Es konnte auch mittels Elektropräzipitation und Impingement Aujeszky-Disease-Virus aus der Luft von seropositiven bzw. klinisch erkrankten Beständen isoliert werden (MACK et al. 1986). Nach Infektion von geimpften und nicht geimpften Tieren mit Aujeszky-Disease-Virus, wurde in der Luft aller Schweine Virus mit Hilfe eines Zyklon-Sammlers gefunden, obwohl signifikant weniger bei den geimpften Tieren (BOURGUEIL et al. 1992b). Eine aerogene Übertragung dieser Erkrankung ist anzunehmen (GILLESPIE et al. 1996, GILLESPIE et al. 2000). Das Virus der Klassischen Schweinepest wurde in der Luft von infizierten Tieren unter Verwendung eines Gelatinefilters gesammelt, wobei in nur einer von zahlreichen Proben infektiöses Virus nachgewiesen werden konnte. Die Virusdetektion mittels PCR war hier bedeutend erfolgreicher (WEESENDORP et al. 2008). Eine aerogene Übertragung von Influenzavirus A zwischen Schweineherden wird ebenso angenommen (WOESTE u. GROSSE BEILAGE 2007). Abschließend zu den porcinen Viren soll das Porcine Respiratorische Coronavirus aufgezählt werden, welches auch in Luftproben infizierter Tiere gefunden wurde (BOURGUEIL et al. 1992a, CHO et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit steht die aerogene Ausscheidung aviärer Viren im Mittelpunkt. Im Vergleich zu den porcinen Erkrankungen wurden dazu bisher deutlich weniger Untersuchungen durchgeführt. Die Übertragung der Newcastle Disease über den Luftweg gilt als gesichert. Schon in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts konnten DELAY et al. (1948) erstmals das Virus in der Stallluft infizierter Tiere nachweisen. HUGH-JONES et al. (1973) infizierten Hühner mit verschiedenen Stämmen des Newcastle-Disease-Virus und sammelten täglich Luftproben mit dem „Litton Large Volume Air Sampler“, welcher nach dem Prinzip der Elektropräzipitation funktioniert. Die Virusmenge, die aus der Luft isoliert werden konnte, war vom zur Infektion der Tiere verwendeten Stamm abhängig. Die Wissenschaftler analysierten auch Luftproben in und außerhalb von Ställen, in denen die Atypische Geflügelpest ausgebrochen war. Sie konnten Newcastle-Disease-Virus in der Größenordnung von ca. $10^{5,5}$ EID₅₀ pro 33 m³ Luft nachweisen. Bei dem Vergleich der aerogenen Virusausscheidung von geimpften und nicht geimpften Tieren nach Infektion mit einem Wildtyp des Virus, schieden die ungeimpften Tiere signifikant höher Virusmengen in die Luft aus (HUGH-JONES et al. 1973). HIETALA et al. (2005) sammelte das Newcastle-Disease-Virus während eines Ausbruchs 2002/2003 in Kalifornien in der Luft von

betroffenen Geflügelställen. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der PCR, wobei nur geringe Viruskonzentrationen in relativ großen Luftproben (von ca. 127 m³) gefunden werden konnten. LI et al. (2008) fanden in einem Infektionsversuch heraus, dass zum einen gesunde Hühner, welche nur mit der Abluft infizierter Hühner in Kontakt kamen, auch erkrankten; zum anderen, dass das NDV von Tag 2 bis 40 nach der Infektion in die Luft ausgeschieden wurde. Nach HOPKINS u. DRURY (1971) halten die Luftfilter in kommerziellen Geflügelställen Newcastle-Disease-Virus sehr effektiv zurück und verhindern somit eine Ausbreitung der Viren in die Umgebung.

2.3 Quantitative Real-Time-PCR

Seit der Entdeckung der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in den achtziger Jahren hat diese Technik eine enorme Bedeutung in der modernen Wissenschaft und Technik bekommen. Durch die PCR ist eine Vervielfältigung von sehr kleinen Nukleinsäuremengen aus verschiedenen Ausgangssubstanzen mit anschließender Detektion möglich (MULLIS u. FALOONA 1987). Jetzt können neben der qualitativen Aussage über Vorhandensein eines bestimmten Gens auch quantitative Bestimmungen der Kopienzahl vorgenommen werden. Diese Technik wird zunehmend zur Untersuchung von Luftproben verwendet und stellt auch in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Methode dar.

2.3.1 Grundlagen der Real-Time-PCR

Das System der Real-Time-PCR beruht auf demselben Prinzip wie das der konventionellen PCR und lässt sich wie folgt beschreiben: Zuerst erfolgt die *Denaturierung* der doppelsträngigen DNA bei Temperaturen von ca. 95 °C. Danach lagern sich am 5'- und am 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches die Primer, zielsequenz-spezifische Oligonukleotide, an. Dieser Vorgang wird als *Annealing* bezeichnet und findet bei Temperaturen von 55-65 °C, abhängig von Länge und Sequenz der Primer, statt. Im nächsten Schritt werden die Primer durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase unter Anwesenheit freier Nukleotide verlängert (*Elongation*). Die dabei notwendige Temperatur ist von der verwendeten DNA-Polymerase abhängig und liegt zwischen 68 und 72 °C. Die Elongation erfolgt so lange bis ein Abbruch durch erneute Temperaturerhöhung auf ca. 95 °C erfolgt. Damit werden die synthetisierten DNA-Doppelstränge wieder denaturiert. Die Abfolge der drei beschriebenen Vorgänge bezeichnet man als Zyklus, wobei die Anzahl an DNA-Molekülen theoretisch von Zyklus zu Zyklus verdoppelt wird. Dies entspräche einem Multiplikationsfaktor von 2. Der wirkliche durchschnittliche Multiplikationsfaktor bezogen auf die Gesamtreaktion liegt bei ca. 1,7 - 1,9 (HOLZAPFEL u. WICKERT 2007). Der Grund dafür ist, dass die Vermehrung der DNA im Verlauf der PCR nicht, wie theoretisch angenommen, die ganze Zeit exponentiell verläuft, sondern die Reaktion am Ende über einen linearen Bereich schließlich in eine Plateau-Phase übergeht. Dafür gibt es verschiedene Ursachen, wie die sinkende Aktivität der Polymerase, verbrauchte Reaktionskomponenten oder die steigende Anzahl an synthetisierten Molekülen (ADAMS et al. 1982; WATERFALL et al. 2002, Pfaffl 2004).

Bei der Real-Time-PCR wird die beschriebene Amplifikation mit der Detektion der entstandenen Amplifikationsprodukte kombiniert und erfolgt in einem Reaktionsansatz. Der aufwendige Schritt der Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese, wie bei der konventionellen PCR, bleibt somit erspart. Mittels interkalierender, fluoreszierender Farbstoffe konnten die entstehen-

den Produkte erstmals durch HIGUCHI et al. (1992) direkt gemessen werden. Durch Kombination des Thermocyclers mit einer Lichtquelle sowie einem Detektionssystem für die Fluoreszenz erfolgt dabei die Erfassung der Amplifikationsprodukte auch während der Reaktion, also in Echtzeit (engl.: real-time) (ISHIGURO et al. 1995, WITTEWERT et al. 1997).

Man unterscheidet prinzipiell zwei Detektionssysteme. Zum einen interkalierende Farbstoffe, welche unspezifisch an doppelsträngige DNA binden und so zur Fluoreszenz angeregt werden (z.B. SYBR[®] Green). Zum anderen fluoreszenzmarkierte Sonden, welche spezifisch an die DNA binden. Die emittierte Fluoreszenz wird während jedes Zyklus gemessen und graphisch als Amplifikationskurve dargestellt. Beide Methoden nutzen die Tatsache, dass der Anstieg der Fluoreszenz im Verlauf der Reaktion proportional zum Anstieg der Menge an Amplifikationsprodukten ist. Dadurch ist mittels entsprechender mathematischer Auswertung auch eine Quantifizierung der Ausgangs-DNA möglich.

2.3.2 Fluoreszenzmarkierte Sonden

Da in der vorliegenden Arbeit fluoreszenzmarkierte Sonden (engl.: probe) in der Real-Time-PCR eingesetzt wurden, soll auf diese näher eingegangen werden. Sonden sind Oligonukleotide aus 20 bis 30 Basen, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Sonden hybridisieren während der PCR-Reaktion auf dem DNA-Bereich der Zielsequenz, welcher zwischen den beiden Primern liegt. Die Sequenz der Sonden muss demnach zusammen mit der der Primer ermittelt und aufeinander abgestimmt werden.

Es kommen verschiedene Sonden zum Einsatz, welche alle auf dem gleichen Mechanismus des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) beruhen (CARDULLO et al. 1988). FRET ist ein physikalischer Prozess, bei dem die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffes (genannt Donor/Reporter) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (genannt Akzeptor/Quencher) übergeht. Dies ist nur möglich, wenn Donor/Reporter und Akzeptor/Quencher nur wenige Nanometer (maximal 17-20 Basen) voneinander getrennt sind und das Emissionsspektrum des Donors/Reporters mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors/Quenchers übereinstimmt. Wird der Donor/Reporter angeregt, dann gibt dieser die Energie nicht in Form von Fluoreszenzlicht ab, sondern die Energie wird direkt auf den Akzeptor/Quencher übertragen, welcher dann Licht einer anderen spezifischen Wellenlänge emittiert. Je nachdem welches Fluoreszenzlicht gemessen wird, erfolgt die Bezeichnung als Donor und Akzeptor (Messung des Lichtes des Akzeptors) oder als Reporter und Quencher (Messung des Lichtes des Reporters).

Eine sehr häufig und auch in dieser Arbeit eingesetzte Sondenart ist die TaqMan[®]-Sonde (Abbildung 1). Diese Hydrolysesonde ist an ihrem 3'- und 5'-Ende mit unterschiedlich fluores-

zierenden Farbstoffen markiert. Diese stellen Reporter (5'-Ende) und Quencher (3'-Ende) dar. Es gibt zahlreiche Farbstoffe für Reporter (z.B. FAM, HEX, Cy5) und Quencher (z.B. TAMRA, BBQ, BHQ). Solange die Sonde intakt ist, wird die abgestrahlte Energie des Reporters vom Quencher aufgenommen und als Licht seiner spezifischen Wellenlänge emittiert (WALKER 2002). Es heißt auch, dass das abgestrahlte Licht des Reporters „gequenched“ (unterdrückt) wird. Bei der PCR bindet die Sonde spezifisch an die denaturierte DNA. Am 3'-Ende der Sonde befindet sich eine Phosphatgruppe, damit diese nicht als Vorlage zur Elongation verwendet werden kann. Während der Verlängerung der Primer trifft die DNA-Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert diese (HOLZAPFEL u. WICKERT 2007). Dafür muss die Polymerase eine 3'- 5'- Exonukleaseaktivität besitzen. Durch die Spaltung der Sonde werden Reporter und Quencher räumlich getrennt, wodurch das vom Reporter emittierte Licht nicht mehr vom Quencher absorbiert wird. Das Fluoreszenzlicht des Reporters wird gemessen. Je mehr Amplifikationsprodukte entstehen, umso höher ist der Anstieg der Fluoreszenz des Reporters.

Neben den TaqMan[®]-Sonden gibt es noch zahlreiche andere Sonden, welche im Grunde aber auf dem gleichen Prinzip basieren.

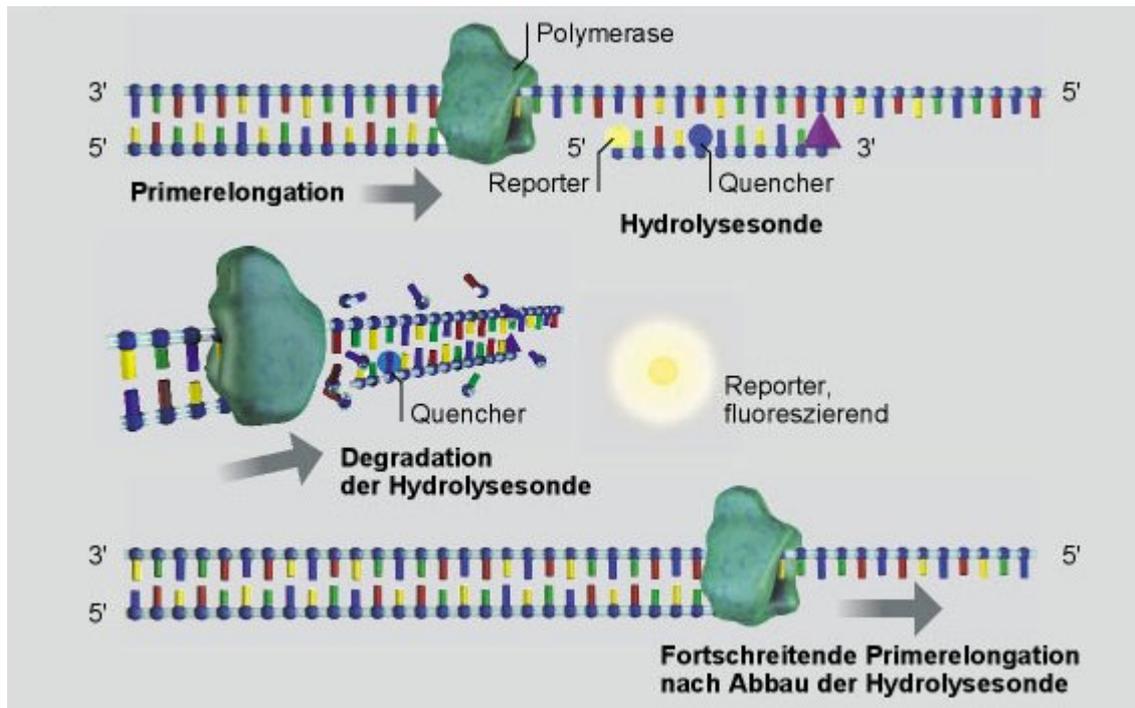


Abbildung 1: Prinzip der Funktionsweise einer TaqMan[®]-Sonde. Nachdem Primer und Sonde am DNA-Strang hybridisiert haben, beginnt die Verlängerung der Primer durch die Polymerase. Trifft die Polymerase auf die Sonde, wird diese durch die 3'- 5'- Exonukleaseaktivität des Enzyms gespalten. Dadurch verlieren Reporter und Quencher ihre räumliche Nähe. Die Energie des Reporters kann nicht mehr vom Quencher aufgenommen werden, sondern wird als Fluoreszenzlicht abgestrahlt und detektiert. (Bildquelle: <http://www.roche.de>)

2.3.3 Auswertung der Real-Time-PCR

Die Auswertung der Real-Time-PCR erfolgt über die Messung der abgegebenen Fluoreszenz eines Farbstoffes. Dabei unterscheidet man die Endpunkt- und Echtzeitmessung. Bei der Endpunktmessung wird die Fluoreszenz der Probe am Anfang und am Ende der gesamten Reaktion ermittelt. Die während des gesamten Prozesses ablaufenden Amplifikationen können somit nicht beobachtet werden. Dadurch ist nur ein qualitativer Nachweis von Genom möglich.

Bei der Echtzeitmessung, welche auch in dieser Arbeit genutzt wurde, wird die Fluoreszenz in jedem Zyklus der PCR gemessen. Die Messwerte werden graphisch dargestellt, indem die Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen wird. Die in der PCR eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe sowie anderen Materialien haben eine gewisse Grundfluoreszenz, so dass immer ein Hintergrundsignal gemessen werden kann. Es wird also schon am Anfang des Prozesses ein Fluoreszenzwert gemessen. Durch die Amplifikationsprozesse in einer positiven Probe steigt die Fluoreszenz während der Reaktion an und hebt sich so vom Hintergrundsignal ab. Eine Pro-

be wird dann als positiv gewertet, wenn die Fluoreszenz der Probe einen Schwellenwert (Threshold) überschreitet. Der Zeitpunkt dieser Schwellenwertüberschreitung wird als C_T -Wert (Cycle-Threshold) angegeben. Dieser Wert gibt den Zyklus an, in welchem die Fluoreszenz der Probe erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz gestiegen ist und somit als positiv gewertet werden kann. Vom C_T -Wert kann man direkt auf die Ausgangsmenge der DNA schließen. Bei niedriger Ausgangsmenge steigt die Fluoreszenz erst spät über den Schwellenwert (da die DNA über viele Zyklen hinweg repliziert werden muss) und der C_T -Wert ist hoch. Bei hoher Ausgangsmenge ist der C_T -Wert niedrig. Vor dem Anstieg findet auch schon eine Vervielfältigung statt, wobei die gebildete Produktmenge noch zu gering ist, um eine ausreichend hohe Fluoreszenz zu erzeugen. Graphisch wird dies als parallel zur X-Achse verlaufende Linie, genannt Basislinie, dargestellt.

Zur Verringerung von Messfehlern besteht die Möglichkeit einen Referenzfarbstoff (z.B. ROX) zu verwenden. Dieser Farbstoff wird zu jedem Reaktionsansatz in konstanter Menge hinzu gegeben. Dessen Fluoreszenz, welche im Verlauf der Reaktion etwa gleich bleibt, wird während der PCR erfasst. Die detektierte Fluoreszenz der Probe wird mit der Fluoreszenz des Referenzfarbstoffes verrechnet. Dadurch können Pipettierfehler und daraus resultierende Fluoreszenzunterschiede der Sonde sowie Abweichungen durch die Optik z.T. ausgeglichen werden (DORAK 2006).

2.3.4 Quantifizierung mittels Real-Time-PCR

Die Beziehung des C_T -Wertes zur Ausgangsmenge an DNA in der Probe wird für die Quantifizierung in der Real-Time-PCR genutzt. Dabei wird parallel immer eine Probe mit bekannter DNA-Menge untersucht und die C_T -Werte der beiden Proben verglichen. Es wird eine absolute und relative Quantifizierung unterschieden (PFAFFL 2001).

2.3.4.1 Absolute Quantifizierung

Bei dieser Quantifizierungsart wird die genaue Menge an Nukleinsäuren und somit z.B. die Virusmenge in einer Probe bestimmt. Dafür muss stets eine Eichprobe (sog. Standardprobe) mit bekannter Nukleinsäurekonzentration in einer Standardkurve parallel analysiert werden. Die Erstellung einer Standardkurve erfolgt durch die Verdünnung der Standardprobe, wobei jede Verdünnungsstufe in einem eigenen Reaktionsansatz die PCR durchläuft. Die ermittelten C_T -Werte werden in einem Diagramm gegen den dekadischen Logarithmus der Genomkopienanzahl aufgetragen. Durch Interpolation der Punkte der verschiedenen Konzentrationen der Verdünnungsreihe ergibt sich die Standardkurve (Abbildung 2). Die Anzahl an Genomkopien in der Ausgangsprobe kann mittels dieser Kurve bestimmt werden (FREEMAN et al. 1999). Der Stan-

darbereich sollte die erwartete Konzentration in der Probe abdecken (FRONHOFFS et al. 2002).

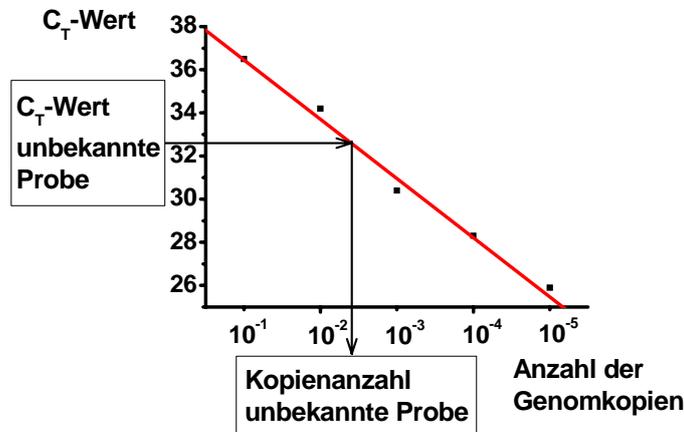


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Standardkurve in der Real-Time-PCR.

Die verwendete Standardprobe sollte eine ähnliche Sequenz wie die Zielsequenz besitzen und mit denselben Primern amplifiziert werden. Dadurch werden unterschiedliche Effizienzen der PCR vermieden. Als Standardprobe können z.B. Plasmide mit der klonierten Zielsequenz oder auch Virussuspensionen mit bekanntem Titer verwendet werden. Es erfolgt die Herstellung einer größeren DNA-Menge, welche über alle Experimente hinweg als Standard dient.

Diese Technik birgt jedoch den entscheidenden Nachteil des Fehlens einer internen Kontrolle. Dadurch sind bei geringen Abweichungen der Effizienz der PCR von Standardprobe und unbekannter Probe große Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung zu erwarten. Zusätzlich treten bei der Probenbearbeitung vor der PCR, wie Genomisolierung und -umschreibung bereits erhebliche Schwankungen auf. Diese werden mit der absoluten Quantifizierung nicht berücksichtigt.

2.3.4.2 Relative Quantifizierung

Diese Quantifizierung wird sehr häufig angewandt. Dabei wird allerdings nicht die genaue Zahl an Genomkopien bestimmt. Vielmehr wird die Menge an DNA in einer bekannten Probe mit der Menge an DNA in unbekanntem Proben ins Verhältnis gesetzt. Dabei spielt die DNA-Menge in der bekannten Probe keine Rolle (BUSTIN 2000, LIVAK u. SCHMITTGEN 2001).

In den Proben kann eine endogene Kontrolle, ein sog. Housekeeping Gene, mitgeführt werden. Dieses Referenzgen dient zur Normalisierung aller Proben. Es sollte in jeder Probe in gleicher Menge vorhanden sein. Oft werden dazu konstant exprimierte Gene, welche in allen Zellen vorkommen, verwendet (z.B. Gene, die für β -Aktin oder GAPDH kodieren). Durch diese endo-

gene Kontrolle werden methodische Fehler aus Vorgängen vor der PCR sowie von Probe zu Probe variierende PCR-Effizienzen ausgeglichen. Von großer Bedeutung ist die Genomisolierung und die reverse Transkription. Die Ausbeute an DNA und RNA kann dabei von Probe zu Probe extrem schwanken (VANDESOMPELE et al. 2002). Da die endogene Kontrolle genauso wie die Probe behandelt wird, unterliegt sie denselben Schwankungen. In der PCR werden die C_T -Werte der unbekannt Probe mit den C_T -Werten des Referenzgens verrechnet und so normalisiert. Für noch präzisere Ergebnisse können die Effizienzen der PCRs von Referenz- und Zielgen in die Berechnungen mit einbezogen werden (PFAFFL 2004). Da Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert werden können, ist es auch möglich, die Zielsequenz und das Referenzgen als Multiplex-PCR in einem Ansatz zu detektieren. Man kann sie jedoch auch getrennt in zwei unterschiedlichen Reaktionsgefäßen messen.

Die Berechnung ist anhand einer Standardkurve oder mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (LIVAK u. SCHMITTGEN 2001) möglich. Bei der Standardkurven-Methode werden Quotienten aus der Kopienzahl von Ziel- und Referenzgen in den Proben gebildet und diese miteinander verglichen. Für die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ist es Voraussetzung, dass die PCR-Reaktionen von Zielsequenz sowie Referenzgen die gleiche Effizienz besitzen (HOLZAPFEL u. WICKERT 2007). Dies muss vorher genau optimiert werden. Der C_T -Wert des Referenzgens in Probe A wird vom C_T -Wert des Zielgens in Probe A subtrahiert (ΔC_T -Wert), womit die Probe normalisiert ist. Das gleiche wird mit Probe B durchgeführt. Die beiden ΔC_T -Werte werden voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) und in $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt. Damit kann das Verhältnis von Probe A zu B genau bestimmt werden. Eine der beiden Proben fungiert dann als Calibrator und wird dem Wert 1 gesetzt werden. Gegen diesen Calibrator können dann verschiedene unbekannt Proben ins Verhältnis gesetzt werden und so untereinander verglichen werden. Diese präzise Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Verwendete Zellkulturen

Für die Virusvermehrung und -nachweis wurden zwei Zelllinien verwendet, zum einen war dies die Buffalo-Green-Monkey-Zellkultur (BGM). Dabei handelt es sich um eine permanente Zelllinie von Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze. Die Zellen stammen von der Firma MikroLab GmbH in Bremen.

Des Weiteren wurden Crandell-Reese-Feline-Kidney-Zellen (CRFK) benutzt. Diese permanente Zelllinie von Nierenzellen der Katze stammt aus der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin (ZBV) des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit (Katalognummer: RIE 769). Es handelte sich um die 194. Subkultivierung.

3.1.1 Kultivierung der Zellkulturen

Zur Kultivierung beider Zellkulturen wurden Zellkulturflaschen (TPP[®], Trasadingen, Schweiz) von unterschiedlicher Bodenflächengröße (klein: 25 cm², mittel: 75 cm², groß: 150 cm²) verwendet. Als Medium wurde Dulbecco's Minimal Essential Medium (Dulbecco's MEM, Biochrom AG, Berlin), supplementiert mit 5 % fetalem Kälberserum (FKS, Biochrom AG, Berlin) für CRFK-Zellen bzw. 10 % FKS bei BGM-Zellen, verwendet. Das Medium beider Zelllinien wurde zusätzlich mit 1 % nichtessentiellen Aminosäuren (NEA, Biochrom AG, Berlin), 100 IE / ml Penicillin sowie 100 µl / ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin) ergänzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank (CO₂ Unitherm 170, UniEquip, Martinsried) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zur Zellpassage wurde der Zellkulturüberstand vorsichtig abgegossen und verworfen. Die Zellen wurden mit 1 - 2 ml, einer vorher auf Raumtemperatur gebrachten, Trypsin / EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA, Biochrom AG, Berlin) gewaschen. Anschließend wurde soviel Trypsin / EDTA-Lösung in die Zellkulturflasche gegeben, dass der Flaschenboden vollständig benetzt war. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C (BGM-Zellen 20 bis 30 Minuten, CRFK-Zellen ca. 5 Minuten). Wenn sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurden diese unter Hinzugabe von 2 - 10 ml Medium (je nach Zellkulturflaschengröße) resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit Medium bis zur gewünschten Zelldichte verdünnt und auf die Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturtestplatten (TPP[®], Trasadingen, Schweiz) gegeben.

3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen

Zur Kryokonservierung der BGM- bzw. CRFK-Zellen wurden diese wie bei der Passagierung mit Trypsin vom Zellkulturflaschenboden abgelöst und in Medium resuspendiert. Die Suspension wurde bei 2000 U / min für 7 Minuten zentrifugiert (Biofuge stratos, Kendro, Osterrode) und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in Dulbecco's MEM mit 10 % FKS und 10 % Dimethylsulphoxide (DMSO, AppliChem, Darmstadt) resuspendiert, wobei die Menge an verwendetem Medium abhängig von der Größe des gewonnenen Zellpellets war. Die Suspension wurde auf Kryoröhrchen aufgeteilt und für 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Die Zellsuspension wurde danach dauerhaft in Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Gefrierampulle in warmen Wasser geschwenkt und der Inhalt eines Einfrierröhrchens zügig zu einer mit Medium befüllten, mittelgroßen Zellkulturflasche gegeben. Die so neu ausgesäten Zellen wurden mindestens einmal passagiert, bevor sie für eine Virusvermehrung oder -titration weiter verwendet wurden.

3.2 Befruchtete Hühnereier

Zur Virustitration des Newcastle-Disease-Virus wurden spezifisch-pathogenfreie (SPF) Brutereier, bezogen von Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven), verwendet. Die embryonierten Hühnereier wurden spätestens 7 Tage nach Ankunft in den Brutschrank (HEKA Brutgeräte, Rietberg) zur Inkubation gelegt. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C und 60 - 70 % relative Luftfeuchtigkeit.

3.3 Verwendete Viren

3.3.1 Newcastle-Disease-Virus

Es wurde das Newcastle-Disease-Virus (NDV, Stamm LaSota) verwendet, welches als Lebendimpfstoff, AviPro® ND LASOTA, von der Firma Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven, bezogen wurde. Für die ersten Versuche wurde Impfstoff der Charge 6032611 verwendet und später der Charge 7080311. Laut Herstellerangaben liegt der Virustiter bei mindestens 10^6 Ei-infektiöse Dosen 50 pro Impfdosis (EID_{50} / Dosis).

3.3.1.1 Virustitration

Die Virustiterbestimmung für das Newcastle-Disease-Virus erfolgte im bebrüteten Hühnerei. Die embryonierten Eier wurden 8 Tage bei 37 °C inkubiert, dann infiziert und nach weiteren 8 Tagen Bebrütung ausgewertet. Alle Titrations wurden im Vierfachansatz durchgeführt, d.h. pro Verdünnungsstufe wurden 4 Eier infiziert.

Alle Bruteiter wurden vor der Virusinokulierung geschickt und jene ohne lebenden Embryo verworfen. Von der zu untersuchenden Probe wurde eine Verdünnungsreihe erzeugt. Bei allen durchgeführten Titrations von Proben des Newcastle-Disease-Virus wurden diese 1:5 mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) verdünnt. Je nach erwartetem Virustiter wurden unterschiedlich lange Verdünnungsreihen angefertigt.

Zur Infektion des Eis wurde der stumpfe Eipol zuerst mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Mit Hilfe einer Kanüle wurde ein Loch für die spätere Injektion in den Eipol gestochen. Die verdünnten Proben wurden in sterile Spritzen aufgezogen und 0,2 ml in die Allantoishöhle des Eis injiziert. Dazu wurden Kanülen der Größe 26 Gage verwendet und bis zum Konus leicht schräg in das Ei eingeführt. Das Loch im stumpfen Eipol wurde mit Holzleim (UHU, Brühl) verschlossen und die Hühnereier zur weiteren Inkubation in den Brutschrank gelegt.

Nach 8 Tagen weiterer Bebrütung wurden die Eier über Nacht auf 4 °C abgekühlt und anschließend ausgewertet. Dazu wurde der stumpfe Eipol abgeschält und der Embryo entnommen. Zur Auswertung wurden die Embryonen der Eier in beschriftete Petrischalen gelegt.

Drei Eier wurden als Positivkontrolle mit einer Virussuspension von bekanntem Titer beimpft. Mindestens sechs unbehandelte Eier wurden zur Negativkontrolle mitgeführt, wobei 3 Eier einen Tag nach der Infektion dem Brutschrank entnommen und bei 4 °C bis zum Ende der Inkubation der restlichen Eier gelagert wurden. Dadurch kann man bei der Auswertung feststellen, welche Hühnerembryonen direkt nach der Injektion, wahrscheinlich durch Beschädigung infolge des Stichs, Bewegung oder Temperaturschwankung und nicht durch das Virus, abgestorben sind. Die anderen 3 Eier wurden wie die anderen bis zum 16. Bebrütungstag inkubiert und anschließend zur Auswertung hinzugezogen.

Der Virustiter wurde mit der Methode nach Reed und Muench (REED u. MUENCH 1938) ermittelt und als EID₅₀ / ml angegeben. Eine EID₅₀ stellt die Virusdosis dar, bei der 50 % der inokulierten Embryonen infiziert werden.

3.3.2 Infektiöse-Bursitis-Virus

Als zweites Testvirus wurde das Infektiöse-Bursitis-Virus (IBDV, Stamm Cu-1M) verwendet. Auch hierbei handelt es sich um ein Impfvirus, welches als Lebendimpfstoff TAD[®] Gumbo-ro vac von der Firma Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven, bezogen wurde.

Die Chargennummer lautet 6042015 und der Titer wird mit 10² EID₅₀ / Dosis angegeben.

3.3.2.1 Virusvermehrung

Zur Virusvermehrung wurden 2 Ampullen (entspricht 2000 Dosen) des gefriergetrockneten Impfstoffes in 20 ml PBS aufgelöst. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde zu am selben Tag passagierten BGM-Zellen einer großen Zellkulturflasche gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ (CO₂ Unitherm 170, UniEquip, Martinsried). Nach dem Verzeichnen eines eindeutigen cytopathischen Effektes (cpE) bei mindestens 80 % der Zellen am 6. Tag nach der Virusinokulierung wurde die gesamte Kultur über Nacht bei -20 °C eingefroren und anschließend langsam aufgetaut. Es folgte eine Zentrifugation mit 2000 U / min über 10 Minuten. Der Überstand aller inokulierten Flaschen wurde gepoolt, aliquotiert und bei -80 °C tief gefroren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte wie im folgenden Punkt beschrieben.

3.3.2.2 Virustitration

Zur Bestimmung des Virustiters wurde die Suspension 1:2 in PBS bis zu einer Verdünnung von 10^{-6,62} titriert. Dann wurden 100 µl jeder Verdünnung im Vierfachansatz auf die BGM-Zellkultur in einer 96-well-Zellkulturtestplatte übertragen. Bei jeder Virustitration wurde eine Reihe für die Zellkontrolle freigelassen und eine andere mit 100 µl PBS zur Kontrolle bestückt. Nach 6 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnte das Ergebnis lichtmikroskopisch abgelesen und entsprechend protokolliert werden. Der Virustiter wurde nach der Methode von Spearman und Kaerber (MAYR et al. 1974) berechnet und als gewebeinfektiöse Dosis 50 pro ml, abgekürzt mit TCID₅₀ / ml (tissue culture infectious dose), angegeben. Dieser so ermittelte Virustiter sagt, wie viele infektiöse Einheiten im unverdünnten Ausgangsmaterial vorhanden waren.

3.3.3 Felines Calicivirus

Felines Calicivirus (FCV, Stamm KS-20) wurde als Normalizer, anstelle eines Housekeeping Gens, bei der quantitativen Real-Time-PCR verwandt. Das Virus stammt ursprünglich von einer 1995 an Katzenschnupfen erkrankten Katze und wurde an der Ludwig-Maximilian-Universität München isoliert. Dieses Virus wurde in jeder PCR als Referenzgen mitgeführt. Es wurde als Referenzgen ausgewählt, da das Auftreten speziell dieses Stamms in der Luft von Geflügelställen als sehr unwahrscheinlich gilt und somit die PCR-Ergebnisse durch die ausgewählte endogene Kontrolle nicht verfälscht werden können.

3.3.3.1 Virusvermehrung

Felines Calicivirus wurde in der CRFK-Zellkultur vermehrt. Dazu wurde die Kultur mit 0,3 ml einer Stammvirus suspension (Titer: 10^{8,7} TCID₅₀ / ml) beimpft und bei 37 °C und 5 %

CO₂ inkubiert. Sobald 80-90 % der Zellen einen cpE zeigten, wurde die gesamte Zellkultur über Nacht bei -20 °C tief gefroren und anschließend langsam aufgetaut. Analog zu der Vermehrung von IBDV wurde die Virussuspension zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3.3.2 Virustitration

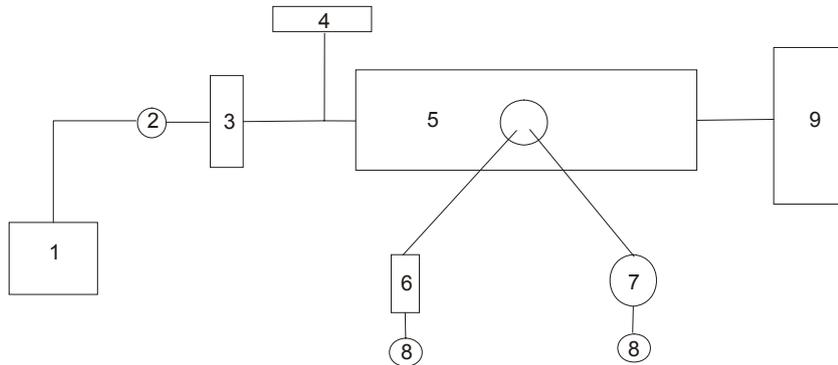
Zur Ermittlung des Infektiositätstiters erfolgte eine Titration von 1:10 in PBS bis zu einer Verdünnungsstufe von 10⁻¹⁰. 100µl jeder Verdünnungsstufe wurde vierfach auf die CRFK-Zellkultur in einer 96-well-Zellkulturtestplatte übertragen und unter den oben erwähnten Bedingungen inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Ergebnis abgelesen und der Titer, angegeben in TCID₅₀ / ml, nach der Methode von Spearman und Kaerber ermittelt.

3.4 Untersuchungen an experimentell erzeugten Virus-aerosolen

3.4.1 Versuchsapparatur

Der Aufbau der Apparatur ist in der Abbildung 3 a und b verdeutlicht. Im Zentrum der Versuchsapparatur stand die Aerosolkammer (Nr. 5). Diese bestand aus Kunststoff und hatte eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von 25,2 cm und einer Länge von 150 cm. Daraus resultierte ein Fassungsvermögen der Kammer von 0,0745 m³. An einem Ende befand sich die Düse mit einem Zugang für Luft und einem zweiten für die Virussuspension. Die Druckluft wurde von einem im Keller positionierten Kompressor (Nr. 1) durch einen Silikonschlauch zu der Aerosolkammer im S2-Labor transportiert. Die Luft passierte einen Druckanzeiger (Nr. 2, in bar) und einen Luftdurchflussmesser (Nr. 1, in l / h, SED Flow Control GmbH, Bad Rappenau), trat durch die Düse in die Kammer ein und wurde am anderen Ende über einen Schlauch in eine Tonne mit Desinfektionsmittel (Nr. 9) geleitet. Zu derselben Eintrittsdüse wurde auch die Virussuspension, welche sich in einer 50 ml-Spritze befand, geleitet. Die Suspension wurde mit Hilfe einer Perfusorpumpe (Nr. 4, Braun®, Melsungen) zu der Düse transportiert und zusammen mit der Luft in die Aerosolkammer vernebelt. In der Mitte der Kammer befanden sich zwei Öffnungen zur Luftprobenentnahme. Von der Innenseite beider Öffnungen ragten zwei Schläuche von gleicher Länge und Durchmesser in die Mitte der Kammer. Außen wurde die eine Öffnung mit einem Impinger (AGI-30, Nr.6), die andere mit einem Tiefenfilter aus Gelatine (Nr. 7, Sartorius AG, Göttingen) verbunden. An beide Nachweissysteme war, zum Ansaugen einer definierten Luftmenge, eine Pumpe (Nr. 8, Achroma GmbH, Müllheim) angeschlossen.

a)



- 1 Luftkompressor
- 2 Druckanzeiger für komprimierte Luft in bar
- 3 Luftdurchflussmesser in l / h (bei atmosphärischen Druck und bei 20 °C)
- 4 Perfusorpumpe mit Virussuspension
- 5 Aerosolkammer (V = 74,5 l)
- 6 Impinger
- 7 Gelatinefilter
- 8 Pumpen zum Luftabsaugen
- 9 Tonne mit Desinfektionsmittel

b)



Abbildung 3: Schematische Darstellung (a) des Apparaturaufbaus der Versuche mit experimentell erzeugten Virusaerosolen in einer Aerosolkammer und Foto (b) der Apparatur.

3.4.2 Vorversuche zum Einfluss des Sammelmediums auf die Infektiösität der Viren und Nachweissysteme

3.4.2.1 Impinger

Zur Auswahl des am besten geeigneten Sammelmediums, welches sich weder nachteilig auf die Infektiösität der Viren noch auf die angewandten Nachweissysteme (Hühnerei und Zellkultur) auswirkt, wurden Vorversuche durchgeführt. Dazu wurde der Impinger mit 30 ml verschie-

dener Sammelflüssigkeiten (PBS, PBS + 1 % FKS, PBS + 5 % FKS) gefüllt. Bei Supplementierung des PBS mit FKS wurden noch 1-2 Tropfen autoklaviertes Olivenöl als Schaumhemmer hinzugefügt. Ein ml Virussuspension wurde hinzugegeben und der Impinger an eine Pumpe angeschlossen. Es wurde Luft mit 10 l / min über 20 min durch den Impinger geleitet. Danach erfolgte die Titerbestimmung des infektiösen Virus im embryonierten Hühnerei bzw. Zellkultur wie in 3.4.4 beschrieben. Dieser Versuch wurde analog mit den verschiedenen Impingerflüssigkeiten ohne Zusatz der Virussuspension durchgeführt, um eine toxische Wirkung der Sammelflüssigkeit auf die Nachweissysteme auszuschließen.

Alle Vorversuche fanden im Doppelansatz mit beiden Testviren statt.

3.4.2.2 Filter

Der Einfluss des Gelatinefilters (Durchmesser 50 mm) und der Probenbearbeitung auf die Infektiosität der Viren sowie auf die Nachweissysteme wurden ebenfalls untersucht. Dafür wurde 1 ml Virussuspension auf den Filter gegeben und dieser 20 min bei Zimmertemperatur in einer verschlossenen Petrischale inkubiert. Anschließend wurden 4 ml Medium, speziell für das jeweilige Virus, hinzugefügt und die Probe wie in Punkt 3.4.4 beschrieben quantitativ analysiert. Zur Prüfung einer Toxizität der Gelatine auf das Zellsystem bzw. die embryonierten Hühnereier wurde ein Filter in 4 ml Medium gelöst und weiter wie eine Probe folglich 3.4.4 behandelt. Auch diese Versuche wurden für beide Viren im Doppelansatz durchgeführt.

3.4.3 Versuchsdurchführung

3.4.3.1 Ablauf

Vor Beginn eines jeden Testdurchlaufes wurde der Innenraum der Aerosolkammer für 15 min mit UV-Licht (254 nm) desinfiziert. Anschließend wurden Impinger, Filter, Virussuspension und Luftschläuche an die beschriebenen Positionen der Kammer angeschlossen. Die Virussuspension wurde kontinuierlich vernebelt, so dass ein konstanter Aerosolfluss in der Kammer entstand. Erst nach Aufbau eines stabilen Aerosols nach circa 10 min, begann die Probenentnahme. Beide Geräte entnahmen parallel die Luftproben, wobei das Volumen der Probe sowie die Probenentnahmegeschwindigkeit identisch waren (Tabelle 1). Pro Testdurchlauf wurden 2 bis 3 Proben hintereinander gezogen. Nach Beendigung eines Versuches wurde für 10 min virusfreie Luft durch die Kammer geleitet.

Der Durchfluss der Virussuspension richtete sich nach der relativen Luftfeuchtigkeit, die in der Aerosolkammer erreicht werden sollte (Tabelle 1). Die Experimente wurden bei zwei verschiedenen relativen Luftfeuchten, einer hohen von ca. 85 % und einer niedrigeren von ca. 50 %, durchgeführt. Die vom Kompressor erzeugte Luft hatte eine eigene relative Luftfeuchtig-

keit von ca. 8 %. (Die relative Luftfeuchtigkeit ist das Verhältnis von spezieller Luftfeuchtigkeit zur Sättigungsfeuchte bei einer spezifischen Temperatur. Die spezielle Luftfeuchtigkeit, auch Wasserdampfgehalt, gibt die Masse an Wasser an, die sich in einer bestimmten Masse feuchter Luft befindet.) Die benötigte Durchflussrate der Virussuspension für die gewünschte Luftfeuchtigkeit wurde vorher berechnet. Dies wird nachfolgend an einem Beispiel erläutert:

Um die gewünschte relative Luftfeuchtigkeit von ca. 85 % in der Aerosolkammer zu erhalten, muss die Virussuspension mit der Geschwindigkeit vernebelt werden, mit welcher (abzüglich der Eigenfeuchte der Kompressorluft von 8 %) eine Luftfeuchte von ca. 77 % erreicht wird. Die Temperatur betrug 17 °C. Dafür liegt die Sättigungsfeuchte bei 14,47 g / m³. Der Luftdurchfluss war 1619 l / h.

Die Formel zur Berechnung der relativen Luftfeuchtigkeit lautet:

$$\text{relative Luftfeuchtigkeit} = \frac{\text{spezifische Luftfeuchtigkeit (in g / m}^3\text{)}}{\text{Sättigungsfeuchte bei spezifischer Temperatur (in g / m}^3\text{)}}.$$

Durch Umstellen erhält man:

$$\text{spezifische Luftfeuchtigkeit} = 0,77 \times 14,47 \text{ g / m}^3 = 11,14 \text{ g / m}^3.$$

Die einzustellende Geschwindigkeit der Perfusorpumpe wird dann anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{spezifische Luftfeuchtigkeit} = \frac{\text{Perfusorgeschwindigkeit (in g / h)}}{\text{Luftdurchfluss (in m}^3\text{ / h)}}.$$

Daraus folgt:

$$\text{Perfusorgeschwindigkeit} = 11,14 \text{ g / m}^3 \times 1,619 \text{ m}^3\text{ / h} = 18 \text{ g / h}.$$

Die Virussuspension muss also mit einer Geschwindigkeit von 18 ml / h vernebelt werden, um eine relative Luftfeuchtigkeit von ca. 85 % in der Aerosolkammer zu erhalten.

Der Luftdurchfluss wurde am Luftdurchflussmesser angezeigt und am Ventil neben dem Druckanzeiger reguliert. Zu beachten ist, dass der wahre Luftdurchfluss nicht direkt am Luftdurchflussmesser abgelesen werden konnte, sondern errechnet werden musste. Die Skala des Luftdurchflussmessers ist auf den Normaldruck von 1 bar geeicht. Bei der verwendeten Apparatur wird jedoch mit einem Überdruck von 1,5 – 1,8 bar gearbeitet. Diese Größe fließt in die Berechnung des wahren Luftdurchflusses ein. Dabei wurde stets ein Korrekturfaktor ermittelt, mit welchem der am Luftdurchflussmesser abgelesene Wert multipliziert wurde und so der wahre Luftdurchfluss errechnet werden konnte. Die Grundlagen zur Berechnung dieses Korrekturfaktors sind im Anhang erläutert.

Die Temperatur der Luft war nur kleinen Schwankungen unterworfen und hatte keinen Einfluss auf das wahre Luftvolumen. Der Luftdurchfluss allerdings variierte im Laufe der gesamten Testzeit auf Grund von schwankender Pumpenleistung, jedoch nicht innerhalb eines einzelnen Testdurchlaufes. Diese daraus resultierenden unterschiedlichen Luftdurchflussraten wurden berücksichtigt und hatten somit keinen Einfluss auf die Ermittlung der Geräteeffizienzen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Angaben zu den Experimenten in der Aerosolkammer

Luftdurchflussrate	Durchflussrate der Virussuspension		Volumen der Luftprobe	Temperatur
	niedrige Luftfeuchtigkeit	hohe Luftfeuchtigkeit		
1108 - 1619 l/h	6,5 - 8 ml / h	12 - 18 ml / h	200 l	17 - 21 °C

Insgesamt wurden 18 Luftproben je Testvirus aus der Aerosolkammer analysiert. Davon wurden 12 Proben bei hoher Luftfeuchtigkeit und 6 bei niedriger genommen.

3.4.3.2 Verwendete Virussuspensionen

Newcastle-Disease-Virus

Für die Testdurchläufe mit NDV wurde 1 Ampulle des gefriergetrockneten Impfvirus in 500 ml PBS aufgelöst und direkt für die Versuche benutzt. Der Virustiter wurde wie in 3.3.1.1 bestimmt und lag bei $10^{6,5}$ EID₅₀ / ml.

Infektiöse-Busitits-Virus

Als Virussuspension zum Vernebeln in der Aerosolkammer wurde Zellkulturüberstand, gewonnen wie in 3.3.2.1 beschrieben, verwendet. Der Virustiter dieser Suspension betrug $10^{7,08}$ TCID₅₀ / ml, bestimmt wie in 3.3.2.2 beschrieben,.

3.4.3.3 Verwendete Sammelgeräte und Probenbearbeitung

Zwei verschiedene Geräte, der Impinger AGI-30 und der Gelatinefilter, wurden zur Luftkeimsammlung eingesetzt. Bei dem Impinger werden die in der Luftprobe enthaltenen Viren in eine Sammelflüssigkeit abgeschieden. Beim Gelatinefilter werden die luftgetragenen Keime in seiner netzartigen Tiefenstruktur zurückgehalten.

Impinger

Der AGI-30 wurde für alle Versuche in der Aerosolkammer eingesetzt. Er wurde mit 30 ml Sammelflüssigkeit bestückt, welche nach den Ergebnissen der in 3.4.2.1 beschriebenen Vorversuchen ausgewählt wurde. Folglich wurde zum Sammeln des IBD-Virus PBS und zum Sammeln des ND-Virus PBS + 1 % FKS + 1 Tropfen Olivenöl gewählt.

Nach einer Luftprobenentnahme wurde der Impinger unverzüglich auf Eis gestellt. Die Sammelflüssigkeit wurde mit Hilfe eines Spritzenfilters mit 0,22 µm Porengröße (TPP[®], Trasadingen, Schweiz) sterilfiltriert, anschließend aliquotiert und bei -80 °C tief gefroren. Eine Ultrazentrifugation der Impingerflüssigkeit und nachfolgender Auflösung des Viruspeletts führte zu keiner Erhöhung der Virusausbeute.

Nach jeder Benutzung wurden die Impinger für 15 min in 4 %-iges Desinfektionsmittel SAFE SEPT (Henry Schein[®], Melville, USA) getaucht, mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und anschließend autoklaviert.

Filter

Es wurden Tiefenfilter aus Gelatine mit einem Durchmesser von 50 mm und einer Porengröße von 3 µm verwendet. Die Gelatinefilter waren steril verpackt und wurden erst kurz vor Gebrauch in eine autoklavierte Halterung eingelegt. Nach der Luftprobenentnahme wurde der Filter sofort in eine mit 4 ml Medium befüllte Petrischale gelegt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Petrischale bei 37 °C für ca. 15 min geschüttelt, um den Filter aufzulösen. Die verflüssigte Probe wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.3.4 Ermittlung der Nachweisgrenzen der Sammelgeräte für die Virusdetektion aus der Luft

Die Sensitivität der Sammelgeräte für die Virusisolierung aus Luftproben der Aerosolkammer wurde ermittelt. Dazu wurde die zu vernebelnde Virussuspension vor Verwendung mit PBS verdünnt, jeweils von 1:10 bis 1:10.000. Ansonsten liefen die Experimente in der Aerosolkammer wie oben für die hohe Luftfeuchtigkeit beschrieben ab und die Proben wurden genauso wie alle anderen bearbeitet und analysiert (folglich 3.4.3).

3.4.4 Quantitative Bestimmung des infektiösen Virus in Luftproben

3.4.4.1 Newcastle-Disease-Virus

Nach der Probenbearbeitung wurde der Virustiter durch Titration der Probenflüssigkeiten im embryonierten Hühnerei, wie in 3.3.1.1 erläutert, bestimmt. Der Titer, angegeben in EID₅₀ / ml,

wurde auf ein Luftvolumen umgerechnet, so dass der Virustiter aller Proben in EID_{50} / m^3 angegeben wird. Aus diesem Titer wurde die prozentuale Viruswiederfindungsrate errechnet.

Stichprobenartig wurde die Allantoisflüssigkeit der Eier von viruspositiv gewerteten Embryonen entnommen. Die Nukleinsäure wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben (folglich 3.5.3.2). Anschließend erfolgte eine qualitative Real-Time-PCR nach dem Pipettierschema von Tabelle 4 b.

3.4.4.2 Infektiöse-Bursitis-Virus

Die Proben der Sammelgeräte wurden bearbeitet und anschließend gleichsam 3.3.2.2 titriert. Der Titer wurde in $TCID_{50} / m^3$ umgerechnet.

Zur Absicherung, dass der cytopathische Effekt der Zellkultur wirklich von dem gesuchten IBD-Virus hervorgerufen wurde, wurden stichprobenartig einige Proben ausgewählt und BGM-Zellen in einer kleinen Zellkulturflasche infiziert. Nach Auftreten des cytopathischen Effekts wurde zellfreier Zellkulturüberstand gewonnen, die RNA isoliert und umgeschrieben (folglich 3.5.3.2). Danach wurde eine qualitative Real-Time-PCR nach Pipettierschema in Tabelle 4 b durchgeführt.

3.4.5 Quantitative Bestimmung des Virusgenoms

Neben der quantitativen Bestimmung von infektiösem Virus erfolgte auch die Quantifizierung des Virusgenoms aus den Luftproben beider Sammelgeräte. Dies wird im Kapitel 3.5.3 genau beschrieben.

3.4.6 Größenbestimmung der Partikel des erzeugten Virusaerosols

Die Tröpfchengröße der vernebelten Virussuspension war für die verwendete Düse nicht bekannt. Deshalb wurde diese Größe mit Hilfe des Andersen-Kaskaden-Impaktors (Wissenschaftlicher Gerätebau, Universität Leipzig) bestimmt. Eine Größenbestimmung der Partikel eines Virusaerosols auf diese Art wurde z.B. auch von IJAZ et al. (1987) oder TSENG u. LI (2005) durchgeführt. Die Methodik wurde in dieser Arbeit jedoch modifiziert. Das Prinzip beruht auf einer Reihenschaltung von Porenplatten. Der Durchmesser dieser Poren verringert sich von Stufe zu Stufe, so dass der Luftstrom beim Passieren der Platten beschleunigt wird. Nach jeder der insgesamt sechs Stufen befindet sich eine Petrischale bestückt mit Agar. Die Luft passiert die Porenplatten, prallt auf die Petrischale, wird gleichzeitig seitlich abgelenkt und gelangt zur nächsten Stufe. Die in der Luft befindlichen Teilchen werden je nach Größe auf der Petrischale abgeschieden oder können der Richtungsänderung des Luftstroms folgen. Dadurch werden die Partikel der Größe nach auf den Petrischalen der verschiedenen Stufen niedergeschla-

gen. Die Porengrößen der Platten sowie die zugeordneten Durchmesser der gesammelten Partikel sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Lochdurchmesser der Porenplatten des Andersen-Kaskaden-Impaktors und Teilchendurchmesser der bei den verschiedenen Stufen abgeschiedenen Partikel.

Stufe	Lochdurchmesser in mm	Teilchendurchmesser in μm
1	1,18	> 8,2
2	0,91	5 - 10,4
3	0,71	3 - 6
4	0,53	2 - 3,5
5	0,34	1 - 2
6	0,25	< 1

In der vorliegenden Arbeit wurden die Petrischalen mit Medium bestückt, welches eine anschließende Untersuchung auf Viruspartikel erlaubt. Dazu wurde zuerst eine Lösung aus PBS und 10 % Gelatine hergestellt und 30 min bei 120 °C inkubiert. Anschließend wurde Dulbecco's MEM mit 100 IE / ml Penicillin sowie 100 μl / ml Streptomycin auf eine Temperatur von 37 °C gebracht und so mit der Gelatinelösung vermischt, dass zum Schluss 3 % Gelatine in Lösung war. Von diesem Medium wurden jeweils 20 ml in die Petrischalen des Impaktors gegeben und bei 4 °C erstarren lassen.

Zur Größenbestimmung der Aerosolpartikel wurde 1 Ampulle AviPro[®] ND LASOTA in 30 ml PBS gelöst und mit 12 ml / h in die Aerosolkammer vernebelt. Der Luftdurchfluss betrug 1107,9 l / h und die relative Luftfeuchtigkeit lag somit bei ca. 85 %. Der Andersen-Kaskaden-Impaktor wurde mit 6 Petrischalen bestückt und an die zentrale Öffnung der Aerosolkammer angeschlossen. Es wurde über 60 min Luft mit 15 l / min entnommen. Anschließend wurde das feste Medium in den Petrischalen bei 37 °C aufgelöst und sterilfiltriert. Nachfolgend wurde die RNA-Isolierung sowie die reverse Transkription wie in 3.5.3.1 und 3.5.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Auswertung der sechs Proben, wobei jede Probe für einen bestimmten Größenbereich der Aerosolpartikel steht, erfolgte mit quantitativer Real-Time-PCR folglich 3.5.3.3. Der prozentuale Anteil der Aerosoltröpfchen in einer Größenfraktion konnte somit zugeordnet werden. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

3.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die in dieser Arbeit etablierte quantitative Real-Time-PCR diente zur Quantifizierung ausgewählter Viren in Luftproben. Als Methode zur Detektion der Amplifikate in der Real-Time-PCR wurden die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten TaqMan[®]-Sonden ausgewählt. Im Gegensatz zu der SYBR[®]-Green-Detektion besitzen diese Sonden eine höhere Spezifität, da sie nur spezifische Amplifikate detektieren. Zur Etablierung dieser PCR mussten zunächst die einzelnen Reaktionen der verwendeten Viren entwickelt und optimiert werden. Für alle drei Viren (NDV, IBDV, FCV) wurden Oligonukleotide (Primer) sowie Sonden speziell für den jeweiligen Stamm neu entworfen und jede PCR optimiert. Alle Real-Time-PCRs liefen in dem Thermocycler MX 3000P[®] (Stratagene, West Cedar Creek, USA) ab.

3.5.1 Verwendete Primer und Sonden

Alle im Folgenden beschriebenen Primer und Sonden wurden mit der Software LASERGENE[®] (DNASTAR Inc., Madison, USA) gesucht und von der Firma Biomers[®] (Ulm) synthetisiert. Bei dem Design der Primer wurde die Sequenz des verwendeten Virusstammes jeweils mit verschiedenen Sequenzen von Wildstämmen des Virus durch Alignment verglichen. Die Primer wurden so ausgewählt, dass nur spezifisch das Genom des verwendeten Stammes detektiert wird. Bei den verwendeten Sonden handelt es sich um sogenannte TaqMan[®]-Sonden (auch Hydrolysesonden genannt), welche am 3'-Ende mit dem Quencher und am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Als Quencher wurde bei der Sonde für NDV sowie IBDV BHQ-1 (BlackHole Quencher), bei der für FCV BBQ-650 (BlackBerry Quencher) verwendet. Der Reporterfarbstoff war bei der NDV- und IBDV-Sonde FAM (Fluorescein), bei FCV Cy5 (Cyanin). Die genauen Sequenzen der Primer und Sonden sowie das Zielgen der Viren sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Primer- und Sondensequenzen sowie Zielgen der PCR-Reaktionen aller Viren.

Primer bzw. Sonde	Sequenz	Zielgen
NDV <i>Stamm LaSota</i>		fusion protein
NDV-Las 1F	5'-gtaggatacaagagtctgtgactacatctg-3'	
NDV-Las 1R	5'-agccacaccgccaataatg-3'	
NDV-Las Pr	5'-aggggggagacagggggcct-3'	
IBDV <i>Stamm Cu1-M</i>		VP1 Segment B
IBDV-2F	5'-gctttgatgggacaacggtaat-3'	
IBDV-2R	5'-cacaagattgaatggcataagggt-3'	
IBDV-Pr	5'-tgacgaccggcaccgacaacc-3'	
FCV <i>Stamm KS-20</i>		VP1
FCV-1F	5'-ttttgttgcgtttcaagcata-3'	
FCV-1R	5'-agaggcaagccgaatctttg-3'	
FCV-Pr	5'-tcccctttctgcctcctacatggaa-3'	

3.5.2 Optimierung der Real-Time-PCR

Für eine möglichst exakte Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen Virusgenommenge mit Hilfe der Real-Time-PCR mussten alle Polymerasekettenreaktionen, die später ablaufen sollten, optimiert werden. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich dabei um die Reaktionen der Testviren (NDV und IBDV) und des Virus für die endogene Referenz in der PCR (FCV). Zunächst wurden nur die Primer in der Reaktion eingesetzt und mit dem Verfahren der spezifischen Schmelzkurvenanalyse getestet. Dazu wurde der interkalierende Farbstoff SYBR[®]-Green zur Detektion genutzt. Es wurden diejenigen Primerpaare für die weiteren Reaktionen ausgewählt, bei welchen keine Primerdimere auftraten.

Es ist wichtig, dass die Reaktionen von Ziel- und Referenzgen eine ähnliche, möglichst hohe und reproduzierbare Effizienz von 90 - 100 % besitzen. Zur Optimierung dieser Effizienz werden verschiedene Komponenten eines Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen bis zum Erreichen eines zufrieden stellenden Ergebnisses verändert. Bei den erwähnten Komponenten handelte es sich um die Konzentrationen der eingesetzten Primer und Sonden sowie um das Temperaturschema. Die Optimierung einer Multiplex-PCR, in welcher die Reaktionen

des gesuchten Gens und des Referenzgens in einem gemeinsamen Reaktionsansatz ablaufen, war nicht erfolgreich. Somit wurden die Reaktionen für jedes eingesetzte Virus in getrennten Ansätzen optimiert. Dazu wurden Standardkurven erstellt, mit welchen das Real-Time-PCR-Gerät die Effizienz der PCR in Prozent ermittelte. Zur Anfertigung der Standardkurven wurden Verdünnungsreihen (10^{-1}) der cDNA aller drei Viren hergestellt. Für jede Verdünnungsstufe lief die PCR einzeln ab. Aus den Ergebnissen der verschiedenen Reaktionen wird eine Regressionsgerade, die so genannte Standardkurve, erstellt. Anhand des Anstiegs dieser Gerade wird die Effizienz der abgelaufenen PCR errechnet.

Reaktionsbedingungen sowie die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für alle im Folgenden beschriebenen Polymerasekettenreaktionen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen der Real-Time-PCR (a) des Newcastle-Disease-Virus, Infektiöse-Bursitis-Virus und Felinen Calicivirus und Pipettierschema (b) der Real-Time-PCRs aller verwendeten Viren.

a)

Zyklenanzahl	Reaktionsschritt	Temperatur in °C	Zeit
1	initiale Denaturierung	95	15 min
45	Denaturierung	95	30 s
	Annealing	58	1 min
	Elongation	72	1 min

b)

	NDV	IBDV	FCV
Ansatzvolumen	25 µl	25 µl	25 µl
AB-Mix	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer	1,25 µl (1000 nM)	1 µl (800 nM)	0,5 µl (400 nM)
Reverse Primer	1,25 µl (1000 nM)	1 µl (800 nM)	0,5 µl (400 nM)
Sonde	0,75 µl (600 nM)	0,75 µl (600 nM)	0,75 µl (600 nM)
Wasser	7,75 µl	8,25 µl	9,25 µl
cDNA	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl

3.5.3 Quantifizierung des Virusgenoms aus Luftproben

3.5.3.1 Nukleinsäurepräparation

Die Extraktion der RNA aus den Probenflüssigkeiten ist ein bedeutsamer Schritt, da es unter anderem hier zu großen Verlusten an Nukleinsäure kommen kann. Daher wurden drei verschiedene kommerzielle RNA-Extraktionskits (QIAmp® MinElute Virus Spin Kit, QIAmp® RNeasy Mini Kit, QIAmp® Viral RNA Mini Kit) getestet und der mit den besten Ergebnissen für alle verschiedenen Probenflüssigkeiten, d. h. Impingerflüssigkeit, aufgelöste Gelatine und zellfreier Zellkulturüberstand, ausgewählt.

Die Proben wurden zu Beginn mit Felinem Calicivirus versetzt, welches als endogene Kontrolle in der quantitativen Real-Time-PCR fungiert. Dazu wurde vorher ein Vorrat an FCV durch Virusvermehrung wie in 3.3.3.1 beschrieben hergestellt und wie in 3.3.3.2 titriert. Der resultierende Virustiter war mit $10^{8,125}$ TCID₅₀ / ml sehr hoch, so dass als endogene Kontrolle stets eine Verdünnung dieser Suspension von 1:100 eingesetzt wurde. Es wurde eine Mischung aus diesem verdünnten, zellfreien Zellkulturüberstand des Felinen Calicivirus und der Probenflüssigkeit hergestellt (1 Teil FCV, 9 Teile Probenflüssigkeit). Dieses Gemisch war Ausgang für die Nukleinsäurepräparation, welche mit dem QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) laut Protokoll des Herstellers ausgeführt wurde. Die gewonnene RNA wurde mit 2 µl RNase-

Inhibitor versetzt und bei -80 °C aufbewahrt oder zur sofortigen Weiterbearbeitung auf Eis gestellt.

3.5.3.2 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA (von engl. complementary DNA) erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Transkriptionskit (TaqMan[®] Reverse Transcription Reagent, Applied Biosystems, Darmstadt) im Thermocycler TProfessional (Biometra, Göttingen). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Programm des Thermocyclers sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Zur Lagerung wurde die cDNA bei -20 °C tiefgefroren.

Tabelle 5: Pipettierschema (a) und Thermocyclerprogramm (b) der Reversen Transkription.

a)

Ansatz	40,8 µl
RT - 10x Puffer	8 µl
MgCl	8,8 µl
dNTP-Mix	4 µl
Oligonukleotide	2 µl
RNase-Inhibitor (10 U / µl)	1 µl
MultiScribe	1 µl
Reverse Transkriptase (50 U / µl)	1 µl
RNA	16 µl

b)

Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
48 °C	30 min
95 °C	5 min
4 °C	∞

3.5.3.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die Virusgenomquantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Calibrators nach dem Prinzip der relativen Quantifizierung. Dabei wurden sowohl der Calibrator als auch die unbekanntenen Proben durch eine endogene Kontrolle, hier FCV, normalisiert. Als Calibrator wurde jeweils eine Virus-suspension der zu untersuchenden Testviren, also NDV und IBDV, mit bekanntem Titer verwendet. Der Calibrator wird in der PCR immer 1 gesetzt und alle anderen Proben werden mit diesen ins Verhältnis gesetzt. Aus diesem Verhältnis wurde in der Arbeit ein absoluter Wert für die Virusmenge in den unbekanntenen Proben errechnet. Dies war möglich, da die enthaltene Virusmenge in der Calibratorprobe bekannt war und so von der relativen auf die absolute Menge geschlossen werden konnte. Die Quantifizierung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Diese Methode geht von einer konstanten Kopienverdopplung in jedem Zyklus aus, das heißt die Kurve der

PCR müsste stets expotentiell ansteigen. Dies ist aber nur am Anfang der Reaktion für sehr wenige Zyklen der Fall. Bei der $\Delta\Delta C_T$ -Methode werden die C_T -Werte der Proben zur Quantifizierung herangezogen. Der C_T -Wert einer Probe ist der Zyklus, in welchem die Fluoreszenz so stark angestiegen ist, dass sie erstmals höher als der Schwellenwert ist. Auch zu diesem Zeitpunkt ist der Verlauf der Amplifikationskurve nicht mehr expotentiell und geht schon in die Sättigung über. Jedoch ist der Abfall der Kurve für alle Kurven etwa gleich, wie in Abbildung 4 zu sehen ist. Dadurch sind die verschiedenen C_T -Werte sehr gut vergleichbar und die Quantifizierung präzise.

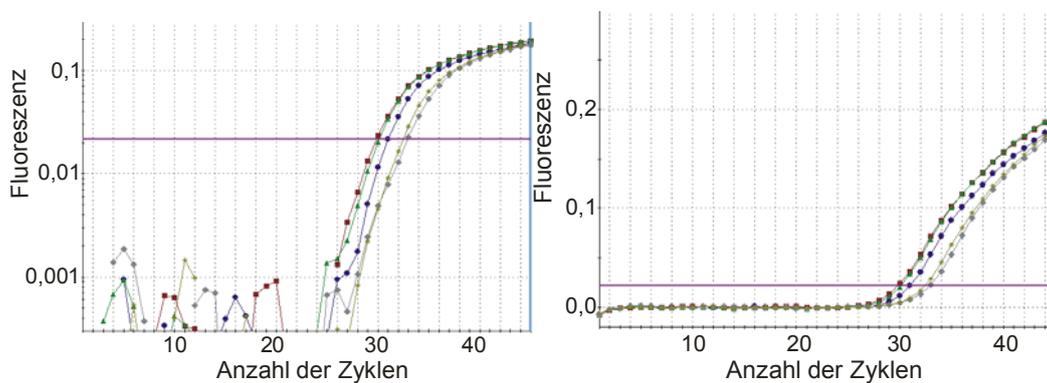


Abbildung 4: Amplifikationskurven des Calibrators und sechs Proben in der logarithmischen Darstellung (links) und der linearen Darstellung (rechts). Links ist zu erkennen, dass ein expotentieller Anstieg der Kurven nur unterhalb der Baseline für 3-4 Zyklen vorhanden ist, danach münden die Kurven nach einem scheinbar linearen Anstieg schließlich in die Plateauphase. In der linearen Darstellung rechts ist auch der sehr ähnliche Verlauf aller Kurven zu erkennen.

Herstellung des Calibrators

Der Calibrator, welcher über alle Experimente hinweg derselbe war, entsprach für beide Testviren dem Zielgen. Zur Quantifizierung des Newcastle-Disease-Virus Stamm LaSota aus den Luftproben wurde also auch dieser Virusstamm als Calibrator benutzt. Dazu wurde eine Ampulle des Impfstoffs in 200 ml destillierten und autoklavierten Wasser aufgelöst. Die Virustiterbestimmung dieser Suspension erfolgte wie in 3.3.1.1 erläutert und betrug $10^{6,99}$ EID₅₀ / ml. Zur quantitativen Bestimmung des Infektiösen-Bursitis-Virus Stamm Cu-1M wurde das Virus wie in 3.3.2.1 beschrieben vermehrt und ein Virusstock aus zellfreiem Zellkulturüberstand hergestellt. Die Titration wurde wie in 3.3.2.2 durchgeführt und ergab $10^{7,85}$ TCID₅₀ / ml. Somit waren die Titer der eingesetzten Calibratoren bekannt.

Der Calibrator wurde entsprechend den Proben behandelt, d.h. er wurde mit derselben endogenen Referenz normalisiert und die RNA-Extraktion sowie die Reverse Transkription erfolgten wie in diesem Kapitel beschrieben. Die Verdünnung der Calibratoren, mit welcher der C_T -Wert

sehr nahe an den C_T -Werten der Luftproben lag, wurde ermittelt. Durch den geringen Abstand der C_T -Werte voneinander, wird die Berechnung des relativen Verhältnisses noch genauer. Somit ergab sich eine Verdünnung von 1:100 für beide als Calibratoren eingesetzten Virussuspensionen. Die Verdünnung mit PBS erfolgte vor der RNA-Extraktion. Es wurde zu Beginn eine große Menge an cDNA hergestellt, gemischt, aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Damit wurde sichergestellt, dass für alle Proben derselbe Calibrator zur Verwendung kam.

Durchführung der Real-Time-PCR

Jede Probe wurde einfach, jedoch in zwei getrennten Reaktionsansätzen, analysiert. Ein Reaktionsansatz diente zur Detektion der Zielsequenz und ein anderer zur Detektion des Referenzgens. Für alle PCR-Reaktionen, in denen dieselbe Zielsequenz quantifiziert werden sollte, wurde ein gemeinsamer Mastermix, der alle Komponenten eines Ansatzes außer die cDNA enthielt, hergestellt. Der Mastermix wurde auf die verschiedenen Reaktionsansätze aufgeteilt. Die cDNA des Calibrators sowie jeder Probe wurde zum einen in den Reaktionsansatz für die Zielsequenz und zum anderen in den Ansatz für das Referenzgen pipettiert. Eine Negativkontrolle für beide Reaktionsansätze mit Wasser anstatt cDNA wurde stets mitgeführt. Als Positivkontrolle diente die Calibratorprobe selbst. Nach Zentrifugation der Proben wurde die PCR mit dem Temperaturschema der Tabelle 4 durchgeführt.

Auswertung der Real-Time-PCR

Alle Proben wurden zu einem für jedes Virus speziellen Calibrator ins Verhältnis (Ratio) gesetzt. Dieses Verhältnis wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta C_T(\text{Calibrator}) = C_T\text{-Wert (Zielgen)} - C_T\text{-Wert (Referenzgen)}$$

$$\Delta C_T(\text{unbekannte Probe}) = C_T\text{-Wert (Zielgen)} - C_T\text{-Wert (Referenzgen)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{unbekannte Probe}) - \Delta C_T(\text{Calibrator})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Das Verhältnis wurde auch graphisch in einem Säulendiagramm dargestellt. Sowohl der Calibrator als auch alle Proben wurden durch das Referenzgen (FCV) normalisiert. Dadurch wurden die unterschiedlichen Verluste bei der RNA-Extraktion und der Reversen Transkription ausgeglichen. Durch diese Fehlerquellenvermeidung sind die Ergebnisse der Quantifizierung realistischer und besser vergleichbar. Aus dem relativen Verhältnis wurde der absolute Virustiter in den Proben berechnet. Dieser Titer der Probe besitzt die gleiche Einheit wie der Titer des verwendeten Calibrators, bei NDV $\text{EID}_{50} / \text{ml}$ und bei IBDV $\text{TCID}_{50} / \text{ml}$. Die Titer wurden auf ein Luftvolumen bezogen und pro m^3 Luftprobe angegeben.

3.6 Aerogene Ausscheidung ausgewählter Impfviren unter experimentellen Bedingungen

Mit den vorher in der Aerosolkammer validierten Messmethoden sollte herausgefunden werden, ob mit Lebendvakzine geimpfte Tiere daraufhin Viren vom Typ des Impfstoffes so ausscheiden, dass diese in Luftproben nachgewiesen werden können. Die Virusdetektion der beiden Sammelverfahren sollte unter den in einem Stall vorherrschenden Bedingungen analysiert werden. Dies wurde anhand der in 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Impfstoffe gegen Newcastle Disease und Infektiöse Bursitis untersucht. Die Versuche wurden bei der Landesdirektion Leipzig angezeigt (Aktenzeichen A 07/08 vom 13.05.08 und A 16/08 vom 13.10.08).

3.6.1 Versuchstiere

Für beide Versuche wurden Hühner der Rasse Cobb-500 verwendet, welche als Eintagsküken beider Geschlechter von der Firma Cobb Germany AVIMEX GmbH (Wiedemar) bezogen wurden. Bei dieser Rasse handelt es sich um Mastelterntiere für Broiler.

3.6.2 Haltung der Versuchstiere

Die Tiere wurden in einem Stall mit einer Grundfläche von 4 m² und einer Höhe von 2 m auf Einstreu gehalten. Es waren Vogelsand, Sitzstangen, erhöhte Ebenen sowie zwei einfache Holzhäuser zur Ausgestaltung des Stalles vorhanden. Futter sowie Wasser hatten die Hühner ad libitum zur Verfügung. Das angewandte Temperaturregime ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Stalltemperaturen während der Haltung.

Lebensalter (Tage)	1. - 2.	3. - 4.	5. - 7.	8. - 14.	15. - 21.	22. - 28.	ab 29.
Stalltemperatur in °C	33 - 34	31 - 32	29 - 30	26 - 27	23 - 25	21 - 22	20 - 21

3.6.3 Versuchsaufbau

Es gab zwei verschiedene Tiergruppen für die Untersuchungen beider Viren. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug 50 für die Untersuchungen zum Newcastle-Disease-Virus und 47 für die zum Infektiösen-Bursitis-Virus. Der Versuchsablauf war bei beiden Viren annähernd identisch und wird im Folgenden beschrieben.

3.6.3.1 Vorbereitende Untersuchungen

Die ungeimpften Tiere wurden am 8. Lebenstag auf das Vorhandensein von maternalen Antikörpern untersucht. Dazu wurde Blut aus der Flügelvene entnommen und mit 5000 U / min über 10 min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bei -20 °C aufbewahrt. Alle Seren wurden mit Hilfe von kommerziellen ELISA-Testkits (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) untersucht. Für die Seren der später mit NDV geimpften Tiergruppe wurde der FLOCKTYPE[®] recNDV, für die der IBDV-Gruppe der FLOCKTYPE[®] recIBDV (beide Labor Diagnostik Leipzig, Leipzig) verwendet. Zudem erfolgte von jedem Tier die Entnahme von Rachen- und Kloakentupfern. Dazu wurden sterile Wattetupfer verwendet, wobei jeweils 10 Tupfer gepoolt wurden. Dieser Tupferpool wurde mit 4 ml PBS versetzt und für 2 min geschüttelt. Danach wurde die Flüssigkeit sterilfiltriert und bei -80 °C gelagert oder zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gestellt. Die Proben wurden mittels qualitativer Real-Time-PCR untersucht. Dazu erfolgte die RNA-Extraktion mit dem QIAmp[®] Viral RNA Mini Kit laut Herstellervorschrift und die Reverse Transkription wie in 3.5.3.2 erläutert. Die Real-Time-PCR zum qualitativen Virusgenomnachweis wurde mit dem Protokoll für das jeweilige Virus, beschrieben in 3.5.2, durchgeführt. Bei negativem Ergebnis der untersuchten Tupferpoolproben sowie negativen Ergebnissen der Antikörpertiter des ELISA-Kits wurden die Tiere geimpft.

3.6.3.2 Vakzinierung

Sowohl der Impfstoff gegen Newcastle Disease (AviPro[®] ND LASOTA) als auch der gegen Infektiöse Bursitis (TAD[®] Gumboro vac) wurden intraokular und über das Trinkwasser verabreicht. Eine Impfstoffampulle beider genannter Viren enthielt 1000 Dosen. Eine Ampulle wurde in 34 ml PBS aufgelöst und pro Tier 1 Tropfen in den Bindehautsack gegeben. Zusätzlich erhielten die Tiere die doppelte Impfdosis über das Trinkwasser, so dass pro Tier insgesamt eine 3-fache Dosis verabreicht wurde. Beide Impfstoffe sind für diese Applikationsarten zugelassen, wobei der intraokulare Verabreichungsweg der Vakzine gegen die Infektiöse Bursitis erst im namensgeänderten Produkt (nun AviPro[®] GUMBORO VAC) vermerkt ist. Nach Auskunft von Lohmann Animal Health bestehen jedoch keinerlei Veränderungen des Impfstoffes, so dass auch der Impfstoff mit altem Namen TAD[®] Gumboro vac ohne Bedenken intraokular angewendet werden konnte.

3.6.3.3 Probenentnahme und –bearbeitung

Ab dem 1. Tag nach der Impfung erfolgte täglich die Entnahme von Luftproben im Stall und von der Stallluft. Für die Stallluftprobe wurde die Lüftung über die Probennahmezeit hinweg abgestellt, um eventuell in die Luft ausgeschiedene Viren zu konzentrieren. Zur Aufrechterhal-

tung der Luftbewegung im Stall wurde ein Ventilator eingesetzt. Zur Sammlung der Abluftproben wurden die Geräte direkt vor der Abluftöffnung positioniert und gleichzeitig mit der Lüftung eingeschaltet. Der Impinger AGI-30, befüllt mit 35 ml virusspezifischer Sammelflüssigkeit (3.4.2.1), wurde verwendet. Dies war etwas mehr Probenflüssigkeit als in den Versuchen mit der Aerosolkammer, da hier mehr Flüssigkeit im Impinger durch die verlängerte Laufzeit verloren ging. Es muss jedoch ein bestimmter Pegel der Flüssigkeit bestehen, damit die Luft gewaschen werden kann. Der Impinger wurde während der Probenentnahme auf Eis gestellt. Das zweite Sammelgerät war der AirPort[®] MD8 (Sartorius, Göttingen). Dabei wurde ein Gelatinefilter mit einem Durchmesser von 80 mm verwendet. Die genauen Probenvolumina sind in Tabelle 7 dargestellt. Der AirPort[®] MD8 mit seiner kürzeren Laufzeit wurde dabei 30 Minuten später als der Impinger im Stall platziert.

Tabelle 7: Volumen der Luftproben und Flussrate der Entnahme.

Gerät	Flussrate der Luftprobenentnahme	Volumen der Proben	
		Stallluft	Abluft
Impinger	12,5 l / min	1000 l	2000 l
AirPort [®] MD8	50 l / min	1000 l	2000 l

Das Volumen der Abluftprobe wurde im Vergleich zur Stallluftprobe verdoppelt, da dort eine niedrige Viruskonzentration angenommen wurde.

Direkt im Anschluss an die Luftsammlung erfolgte die Bearbeitung der Proben. Die Impingerflüssigkeit wurde wie schon in 3.4.3.3 beschrieben behandelt. Der Gelatinefilter, von größerem Durchmesser als bei den Experimenten mit experimentell erzeugtem Virusaerosol, wurde in 6 ml virusspezifischem Medium aufgelöst und sonst genauso bearbeitet wie in 3.4.3.3 beschrieben. Zudem wurden täglich von 20 Tieren Rachen- und Kloakentupferproben entnommen und so bearbeitet wie in 3.6.3.1 beschrieben. Die Auswertung der Proben mittels Real-Time-PCR erfolgte täglich bei den Tupferproben und jeden zweiten Tag bei den Luftproben.

Zusätzlich wurden täglich Lufttemperatur sowie –feuchte dokumentiert.

Nach Beendigung der Probenentnahme (nach 14 Tagen) wurde den Tieren nochmals Blut aus der Flügelvene entnommen und mittels des FLOCKTYPE[®] recNDV bzw. FLOCKTYPE[®] recIBDV auf Vorhandensein von Antikörpern untersucht.

Die Anfangs- sowie Endseren der Tiergruppe des Versuchs mit Newcastle-Disease-Virus wurden nach Versuchsende zusätzlich mit dem ELISA-Kit Flockcheck[®] NDV (Idexx, Ludwigsburg) untersucht und die Ergebnisse mit denen des anderen ELISA-Kits verglichen.

3.7 Aerogene Ausscheidung ausgewählter Impfviren in konventionellen Geflügelhaltungen

Neben den Untersuchungen der Stall- und Abluft nach der Vakzinierung einer kleineren Tiergruppe unter experimentellen Bedingungen, wurden auch Luftanalysen unter Feldbedingungen durchgeführt. Dazu wurden in kommerziellen Geflügelställen nach der Impfung gegen IBDV bzw. NDV verschiedene Proben genommen. Die Sammlung der Luftprobe erfolgte immer mit dem mobilen AirPort® MD8 und hatte ein Volumen von 1000 l mit 50 l / min Sammelgeschwindigkeit. Das Gerät wurde an einer zentralen Stelle des Stalles mit viel Tieraufkommen und -bewegung aufgestellt.

3.7.1 Infektiöse-Bursitis-Virus

Es wurden insgesamt zehn Tierställe eines Betriebes, mit jeweils ca. 23.000 Tieren Besatzdichte untersucht. Die Luftproben wurden nach der ersten Impfung gegen IBDV, erfolgt am 14. Lebenstag, gesammelt. Die Tiere wurden via Trinkwasser mit dem Impfstoff TAD® Gumboro vac (Lohmann Animal Health, Cuxhaven) vakziniert. Als Zeitpunkt der Probenahme wurde der 4. bis 6. Tag nach Vakzinierung gewählt. Zwei Ställe wurden am 3. Tag, sechs am 5. Tag und zwei Ställe am 6. Tag nach der Impfung beprobt. Pro Stall wurde eine Luftprobe gesammelt. Lufttemperatur sowie Luftfeuchtigkeit wurden ebenfalls erfasst.

Nach Beendigung einer Sammlung wurde der Filter sofort in eine sterile Petrischale überführt und 6 ml Medium hinzugegeben. Bis zur Weiterbearbeitung im Labor am selben Tag wurden die Filter bei 2 – 6 °C aufbewahrt.

Die weitere Bearbeitung der Filterproben erfolgte analog 3.4.3.3. Die Proben wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR, wie in 3.5.3 beschrieben, ausgewertet.

3.7.2 Newcastle-Disease-Virus

Zur Prüfung zum Vorkommen des Impfstammes LaSota des Newcastle-Disease-Virus in der Luft von konventionellen Geflügelhaltungen nach der Vakzinierung wurden insgesamt 10 Ställe in zwei verschiedenen Betrieben untersucht. Dabei wurden die Ställe nach der ersten Impfung gegen NDV, welche am 14. Lebenstag erfolgte, und nach der zweiten, erfolgt um den 56. Lebenstag, beprobt. Als Impfstoff wurde immer AviPro® ND LASOTA verwendet. Neben Luftproben wurde zudem stichprobenartig Blut zur serologischen Untersuchung, sowie Rachentupferproben zur Untersuchung mittels Real-Time-PCR entnommen. Darüber hinaus wurden Lufttemperatur und -feuchte erfasst. Der genaue Probenplan ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Probennahmeplan zur Untersuchung der Ausscheidung des Newcastle-Disease-Virus in die Luft von konventionellen Geflügelhaltungen.

Zeitpunkt und Anzahl der Probenentnahmen	Betrieb 1 <i>Stall 1-4</i>	Betrieb 2 <i>Stall 1-6</i>
Luftproben (jeweils am 4. und 6. Tag nach jeder Vakzination)	1 Probe pro Stall	1 Probe pro Stall
Rachentupfer (jeweils am 4. und 6. Tag nach jeder Vakzination)	10 Proben pro Stall	10 Proben jeweils aus Stall 1, 3 und 5
Blutproben (jeweils am 18. und 60. Lebenstag)	10 Proben jeweils aus Stall 1 und 3	10 Proben jeweils aus Stall 1, 3 und 5

In Betrieb 1 wurden vier Ställe untersucht, wobei die Besatzdichte pro Stall bei ca. 14.000 Tieren lag. In Stall 1 und 2 wurde die erste Impfung über das Trinkwasser und in Stall 3 und 4 als Aerosolimpfung verabreicht. Die zweite Impfung erfolgte in allen Ställen über das Trinkwasser. Vom Betrieb 2 wurden sechs Ställe untersucht, wobei alle Vakzinierungen via Trinkwasser durchgeführt wurden. Der Besatz eines Stalles umfasste ca. 7.000 Tiere.

Die Blutproben wurden an der Flügelvene entnommen. Zur Entnahme der Rachentupferproben wurden sterile Wattetupfer verwendet und direkt in sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Luftprobennahme wurden die Gelatinefilter sofort mit 6 ml Medium in eine sterile Petrischale überführt und zusammen mit den Blut- und Tupferproben kühl ins Labor transportiert. Die Filter wurden weiter wie in 3.4.3.3 beschrieben bearbeitet. Die Auswertung erfolgte mittels Real-Time-PCR wie in 3.5.3 erläutert. Die Blutproben wurden mit 5000 U / min über 10 min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bei -20 °C aufbewahrt. Analog den Vakzinationsversuchen unter experimentellen Bedingungen wurden immer 10 Tupferproben gepoolt, mit 4 ml PBS versetzt und 2 min geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde sterilfiltriert und mittels Real-Time-PCR untersucht.

Alle gewonnenen Seren wurden mit dem ELISA-Kit Flockcheck® NDV auf spezifische Antikörper gegen NDV untersucht.

3.8 Statistische Auswertung der Daten

Die ermittelten Messwerte haben, wie es in der Natur der Sache liegt, eine gewisse Ungenauigkeit. Daher wurden viele Datenpunkte ermittelt, die eine genaue statistische Auswertung mit zuverlässigen Aussagen ermöglichen. Die graphischen Darstellungen und statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm OriginPro[®] 8 durchgeführt.

In der Natur und Technik sind die Messwerte im Allgemeinen logarithmisch-normal-verteilt (LIMPERT et al. 2001), das heißt der Logarithmus dieser Daten folgt der Gausschen Normalverteilung. Somit wurde zum genauen Beschreiben der statistischen Messwertverteilung der geometrische Mittelwert x_{geom} mit der geometrischen (oder multiplikativen) Standardabweichung σ^* genutzt. Die Ergebnisse werden daher als $x_{\text{geom}} \times / \sigma^*$ angegeben. Dies bedeutet, dass statistisch gesprochen 68,3 % der Daten im Intervall $[x_{\text{geom}} / \sigma^*, x_{\text{geom}} \times \sigma^*]$ liegen. Für geringe Abweichungen der einzelnen Messwerte vom Mittelwert stimmen die logarithmische Normalverteilung und die (Gaussche) Normalverteilung überein. Darüber hinaus ist letztere sehr vertraut, so dass zusätzlich das arithmetische Mittel mit der (Gausschen) Standardabweichung $x_{\text{arithm}} \pm \sigma$ sowie der Median x_{med} angegeben werden.

Zur vergleichenden Auswertung der Effizienzen beider Sammelgeräte wurde u.a. der t-Test für gepaarte Proben mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0,05$) als Signifikanzniveau angewandt. Voraussetzung für die Verwendung des t-Tests ist eine Normalverteilung der Werte. Diese wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Waren die Werte nicht normalverteilt, wurden sie logarithmiert und erneut auf Normalverteilung geprüft. In der Regel folgten die Werte, wie schon oben erwähnt, einer logarithmischen Normalverteilung und der t-Test konnte angewendet werden (LIMPERT et al. 2001). Bei nicht logarithmisch normalverteilten Werten wurde der verteilungsfreie Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Die Daten wurden graphisch meist als Box-Plot dargestellt. Dabei stellt die Box den Bereich dar, in welchem 50 % der Daten liegen und wird durch das obere und untere Quartil begrenzt. Die beiden Whisker schließen die Werte im Bereich zwischen 5 % und 95 % ein und die Kreuze Werte zwischen 1 und 99 %. Ausreißer werden außerhalb dieser Markierungen dargestellt.

Die Ergebnisse der im ELISA untersuchten Seren wurden mit Hilfe des χ^2 -Quadrattests auf Signifikanzen bei einem Niveau von $p < 0,05$ getestet.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde zur quantitativen Bestimmung des Virusgenoms aus den Luftproben genutzt. Dafür wurden zuvor die einzelnen Reaktionen für jedes Virus optimiert. Zuerst wurde zur Überprüfung der Entstehung von Primerdimeren eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei werden die Schmelztemperaturen der entstehenden PCR-Produkte ermittelt und in einer Schmelzkurve graphisch dargestellt. Die Kurve ergibt sich aus der ersten Ableitung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit zur Temperatur. Optimalerweise hat diese Kurve ein Maximum bei einer für das jeweilige PCR-Produkt spezifischen Temperatur. Das Auftreten von Oligonukleotiddimeren durch Bindung der Primer aneinander und anschließender Amplifikation ist möglich. Dies ist anhand der Schmelzkurve an einem zusätzlichen, meist kleineren Nebenmaximum bei geringerer Temperatur zu erkennen. In keinem Fall war eine Primerdimerbildung zu erkennen. Die Schmelzkurven der Negativkontrollen wiesen ebenfalls keinen spezifischen Schmelzpunkt auf. Abbildungen der Schmelzkurven der Viren und der jeweils mitgeführten Negativkontrolle sind im Anhang (Abbildung 16, 17 und 18) zu finden.

Die Effizienzen der einzelnen Reaktionen, d. h. die Wiederfindungsrate der eingesetzten Templatmenge, wurde anhand von Standardkurven ermittelt und verbessert. Diese Optimierung erfolgte durch Anpassung der Primer- und Sondenkonzentrationen sowie durch Veränderung des Temperaturschemas der Reaktionen. Das Pipettierschema jedes Virus mit den besten erreichten Effizienzen wurde jeweils zweimal im Einzelansatz und einmal im Dreifachansatz wiederholt und die Ergebnisse so bestätigt. Für die Reaktion des NDV betrug die über drei Reaktionsansätze gemittelte Effizienz 97,0 %, für das IBDV 100,0 % und für FCV 99,5 %. Die Abbildungen der Standardkurven sind im Anhang (Abbildung 19, 20 und 21) dargestellt.

Die Quantifizierung des Virusgenoms erfolgte mit Hilfe eines Calibrators nach dem Prinzip der relativen Quantifizierung nach Normalisierung aller Proben mit einer endogenen Kontrolle, wie in 3.5.3.3 beschrieben. Anhand Abbildung 5 soll exemplarisch die Quantifizierung der Virusgenommengen einiger Luftproben der Aerosolkammer dargestellt werden.

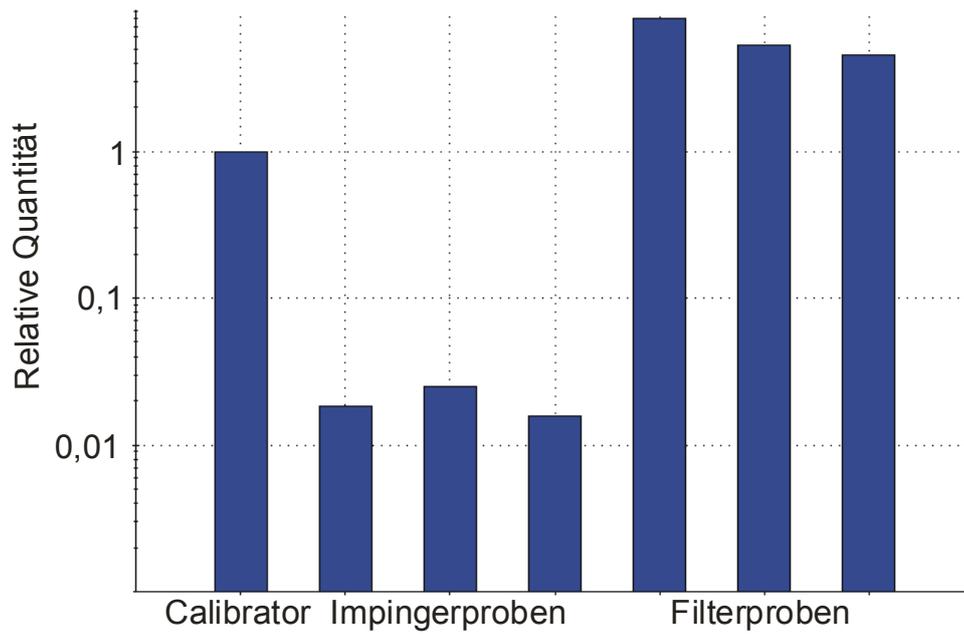


Abbildung 5: Relative Quantifizierung von sechs Luftproben des experimentell erzeugten Virusaerosols. Der erste Balken von links stellt die Calibratorprobe dar und ist gleich 1 gesetzt. Die drei Balken rechts davon stellen Proben des Impingers und die nächsten drei Proben des Gelatinefilters dar.

Bei dieser Quantifizierung wird die genaue Nukleinsäuremenge der Probe im Verhältnis zum Calibrator angegeben. Aus diesem Verhältnis wurde anhand des bekannten Titors der verwendeten Calibratorprobe die absolute Nukleinsäuremenge in den Proben ermittelt.

4.2 Untersuchungen an experimentell erzeugten Virus-aerosolen

4.2.1 Größenbestimmung der Partikel des erzeugten Virusaerosols

Mit Hilfe des Andersen-Kaskaden-Impaktors wurde die Größe der Partikel des experimentell erzeugten Virusaerosols in der verwendeten Kammer bestimmt. Die Teilchen wurden auf sechs mit speziellem Medium bestückten Petrischalen der Größe nach abgeschieden. Nach anschließender Auswertung mittels quantitativer Real-Time-PCR wurde der prozentuale Massenanteil der Partikel einer bestimmten Größenfraktion ermittelt (Abbildung 6).

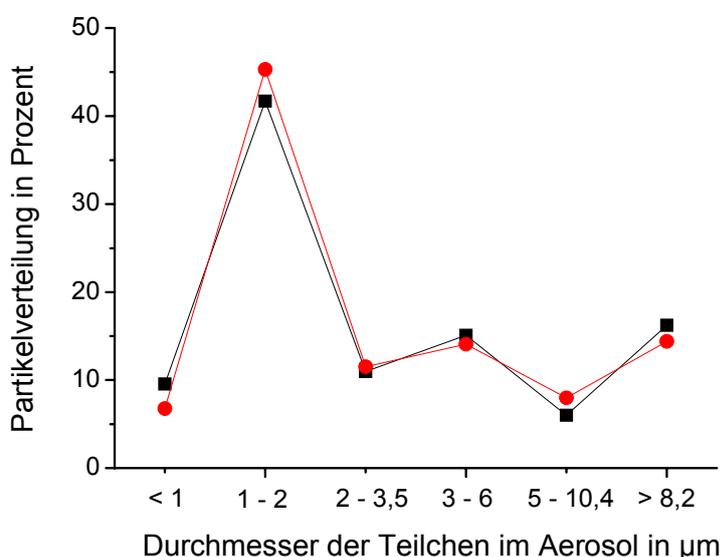


Abbildung 6: Prozentuale Größenverteilung der Partikel des experimentell erzeugten Virus-aerosols. Die roten Punkte stellen die Ergebnisse der ersten Untersuchung dar, die schwarzen Kästchen die der zweiten.

Die Analysen ergaben, dass 43,5 % der Viren in Partikeln von einer Größe zwischen 1 und 2 μm vorkamen. In den restlichen fünf Größenbereichen lagen jeweils ca. 10 % der Viren.

4.2.2 Einfluss des Sammelmediums auf den Nachweis von infektiösen Viren

4.2.2.1 Impinger

Zur Untersuchung des Einflusses der Sammel Flüssigkeit auf die Infektiösität der Viren sowie auf das Nachweissystem wurden verschiedene Vorversuche, erläutert in 3.4.2.1, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 9: Ergebnisse der Vorversuche mit dem Impinger. Der Impinger wurde mit Sammelflüssigkeiten verschiedener Zusammensetzung bestückt, eine bestimmte Menge an Virussuspension wurde hinzugegeben und nach 20-minütiger Laufzeit erfolgte die Virustiterbestimmung im embryonierten Hühnerei (NDV) bzw. in Zellkultur (IBDV). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Sammelflüssigkeit	Wiederfindungsrate des infektiösen Virus	
	Newcastle-Disease-Virus	Infektiöse-Bursitis-Virus
PBS	8,5 %	89,5 %
PBS + 1 % FKS	28,4 %	75 %
PBS + 5 % FKS	24,7 %	66,3 %

Mit den verschiedenen Sammelflüssigkeiten des Impingers wurden unterschiedliche Wiederfindungsraten des infektiösen Virus festgestellt. Dabei konnte bei NDV mit PBS + 1 % FKS und bei IBDV mit PBS als Sammelflüssigkeit die höchste Virusdetektionsrate im embryonierten Hühnerei bzw. in der Zellkultur erreicht werden.

Die verschiedenen Sammelflüssigkeiten des Impingers hatten allein keinen Einfluss auf die embryonierten Hühnereier oder Zellkultur.

4.2.2.2 Filter

Der Einfluss des Gelatinefilters auf den Virusnachweis (NDV im embryonierten Hühnerei bzw. IBDV in der Zellkultur) und auf das Nachweissystem wurde untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Vorversuche mit dem Gelatinefilter.

Wiederfindungsrate des infektiösen Virus	
Newcastle-Disease-Virus	Infektiöse-Bursitis-Virus
51,9 %	95,8 %

Zusätzlich wurde ein alleiniger Einfluss des Gelatinefilters auf das embryonierte Hühnerei und die BGM-Zellkultur untersucht. Dabei konnte bei keinem der beiden Detektionssystemen ein toxischer Effekt festgestellt werden.

4.2.3 Versuche mit dem Newcastle-Disease-Virus

4.2.3.1 Effizienzen der beiden Sammelgeräte

Es wurden insgesamt 18 Luftproben mit zwei Sammelgeräten aus einem experimentell erzeugten Virusaerosol entnommen. Die quantitative Auswertung erfolgte zum einen durch Titration im embryonierten Hühnerei und zum anderen mittels quantitativer Real-Time-PCR. Die Detektionsraten der beiden Sammelgeräte mit den verschiedenen Nachweismethoden sind in Abbildung 7 dargestellt und die genauen Virustiter sind im Anhang (Tabelle 17) beschrieben.

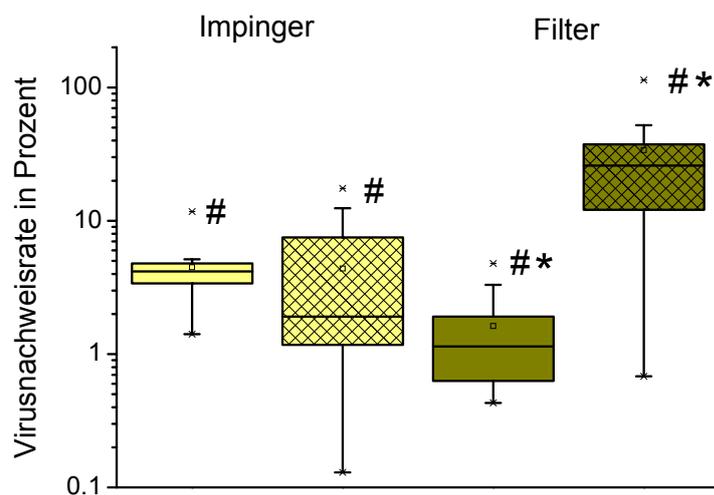


Abbildung 7: Sammeleffizienzen der beiden Sammelgeräte zum Nachweis von NDV aus experimentell erzeugtem Virusaerosol. Die hellgelben Boxen stellen die Ergebnisse für den Impinger dar, die dunkelgelben Boxen die des Filters. Bei Boxen ohne Schraffur erfolgte die Virusquantifizierung im embryoniertem Hühnerei, bei Boxen mit Schraffur in der Real-Time-PCR. # steht für signifikante Unterschiede zwischen den Sammelgeräten bei gleicher Virusnachweismethode. * steht für signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Virusnachweismethoden bei Verwendung desselben Sammelgerätes. ($p < 0,05$; t-Test für gepaarte Proben)

Neben der graphischen Darstellung sind in Tabelle 11 zusätzlich ausgewählte deskriptive statistische Werte aufgeführt.

Tabelle 11: Sammeleffizienzen beider Geräte mit zwei verschiedenen Nachweismethoden zur Detektion von NDV aus einem Virusaerosol. Gelistet sind geometrischer Mittelwert mit geometrischer Standardabweichung, arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung und der Median

Gerät und Methode zum Virusnachweis	geometrischer Mittelwert der Sammeleffizienzen mit geometrischer Standardabweichung	arithmetischer Mittelwert der Sammeleffizienzen mit Standardabweichung	Median
Impinger			
<i>Hühnerei</i>	4,0 % \times / 1,7	4,5 % \pm 2,4 %	4,2 %
<i>quant. PCR</i>	2,1 % \times / 3,9	4,4 % \pm 5,2 %	1,9 %
Filter			
<i>Hühnerei</i>	1,2 % \times / 2,3	1,6 % \pm 1,4 %	1,1 %
<i>quant. PCR</i>	22,3 % \times / 3,1	33,9 % \pm 30,4 %	26 %

Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ konnte festgestellt werden, dass mit dem Impinger eine signifikant höhere Virusnachweisrate für infektiöses NDV (Titration im embryonierten Hühnerei) erzielt werden konnte als mit dem Gelatinefilter. Bei dem Virusnachweis mittels quantitativer Real-Time-PCR erlangte der Filter signifikant höhere Detektionsraten. Bei dem Vergleich der beiden Quantifizierungsmethoden eines Sammelgerätes, war bei Verwendung des Impingers kein signifikanter Unterschied zwischen dem Virusnachweis im embryonierten Hühnerei und mittels quantitativer Real-Time-PCR belegbar. Mit dem Filter hingegen konnten in der PCR signifikant höhere Virustiter ermittelt werden als im embryonierten Hühnerei.

Zusätzlich erfolgte eine Analyse der stichprobenartig entnommenen Allantoisflüssigkeiten von Eiern mit viruspositiv gewerteten Hühnerembryonen in der Real-Time-PCR. Alle Ergebnisse dieser Proben waren positiv.

4.2.3.2 Einfluss der Luftfeuchtigkeit

Die Untersuchungen am Virusaerosol fanden bei zwei verschiedenen Luftfeuchten statt, einer hohen von ca. 85 % und einer niedrigen von ca. 50% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Detektionsraten beider Geräte von infektiösem Virus sind in Abbildung 8 dargestellt.

Die statistische Auswertung unter Anwendung des Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ ergab für den Nachweis von infektiösem Virus mit dem Filter einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Luftfeuchten. Dabei konnte bei einer niedrigeren Luftfeuchte mehr Virus mittels Titration im embryonierten Hühnerei nachgewiesen werden. Mit dem Impinger als Sammelgerät lässt sich die gleiche Tendenz erkennen, jedoch wurde kein signifikanter Unter-

schied errechnet. Bei dem Vergleich der prozentualen Virusnachweisraten ermittelt mit Hilfe quantitativer Real-Time-PCR wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Luftfeuchten ermittelt.

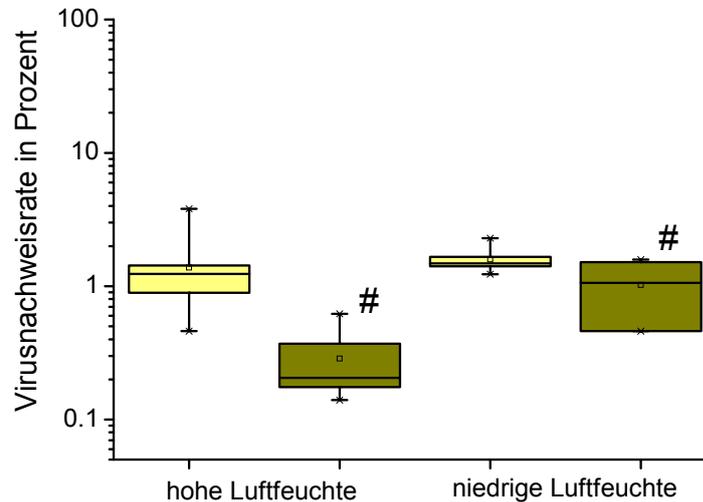


Abbildung 8: Sammeleffizienzen der beiden Sammelgeräte zum Nachweis von infektiösem NDV aus experimentell erzeugtem Virusaerosol bei hoher (85 %) und niedriger (50 %) Luftfeuchtigkeit. Die hellgelben Boxen stellen die Ergebnisse für den Impinger dar, die dunkelgelben Boxen die des Filters. Die Virusquantifizierung erfolgte im embryoniertem Hühnerei. # stellt signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Luftfeuchten bei Verwendung desselben Sammelgerätes dar. ($p < 0,05$; Mann-Whitney-Test)

4.2.4 Versuche mit dem Infektiösen-Bursitis-Virus

4.2.4.1 Nachweisraten der beiden Sammelgeräte

Mit IBDV als Testvirus wurden ebenfalls die Effizienzen beider Sammelgeräte zur Detektion dieses unbehüllten Virus ermittelt. Die Wiederfindungsraten sind in der Abbildung 9 dargestellt. Hierbei wird jedoch nicht nach niedriger und hoher Luftfeuchtigkeit in der Aerosolkammer unterschieden. Der quantitative Nachweis erfolgte zum einen mittels Titration in der Zellkultur und zum anderen durch quantitative Real-Time-PCR. Die genauen Virustiter sind dem Anhang (Tabelle 18) zu entnehmen.

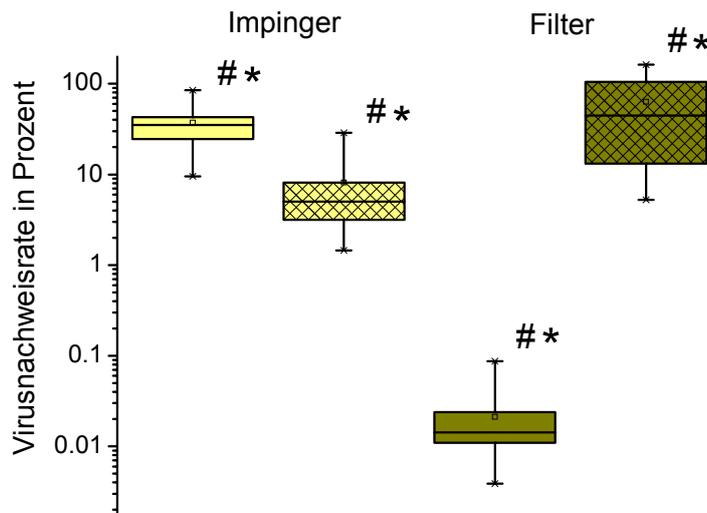


Abbildung 9: Prozentuale Sammeleffizienzen der beiden Geräte zum Nachweis von IBDV aus experimentell erzeugtem Virusaerosol. Die hellgelben Boxen stellen die Ergebnisse für den Impinger dar, die dunkelgelben Boxen die des Filters. Bei Boxen ohne Schraffur erfolgte die Virusquantifizierung in der Zellkultur, bei Boxen mit Schraffur in der Real-Time-PCR. # steht für signifikante Unterschiede zwischen den Sammelgeräten bei gleicher Virusnachweismethode. * steht für signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Virusnachweismethoden bei Verwendung desselben Sammelgerätes. ($p < 0,05$; t-Test für gepaarte Proben)

Ein signifikanter Unterschied lag bei $p < 0,05$ vor. Bei dem Vergleich beider Sammelgeräte konnte infektiöses IBDV durch Titration in der Zellkultur signifikant besser mit dem Impinger als mit dem Filter nachgewiesen werden. Bei der Virusquantifizierung mittels Real-Time-PCR, wurden hingegen in Proben des Filters signifikant höhere Wiederfindungsraten erzielt als in denen des Impingers. Vergleicht man beide Nachweismethoden eines Gerätes, so sind die Virusdetektionsraten des Impingers bei Titration in Zellkultur und die des Filters bei Quantifizierung in der Real-Time-PCR signifikant am höchsten. Die genauen statistischen Angaben dazu sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 12: Sammeleffizienzen beider Geräte mit zwei verschiedenen Nachweismethoden zur Detektion von IBDV aus einem Virusaerosol. Gelistet sind geometrischer Mittelwert mit geometrischer Standardabweichung, arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung und der Median

Gerät und Methode zum Virusnachweis	geometrischer Mittelwert der Sammeleffizienz mit geometrischer Standardabweichung	arithmetischer Mittelwert der Sammeleffizienz mit Standardabweichung	Median
Impinger			
<i>Zellkultur</i>	31,8 % \times / 1,8	37,2 % \pm 20,1 %	35 %
<i>quant. PCR</i>	5,8 % \times / 2,3	8,1 % \pm 7,6 %	5 %
Filter			
<i>Zellkultur</i>	0,016 % \times / 2,2	0,02 % \pm 0,02 %	0,014 %
<i>quant. PCR</i>	36,1 % \times / 3,4	63,4 % \pm 57,3 %	44,6 %

Mit einigen stichprobenartig ausgewählten positiven Proben wurden Zellkulturen infiziert und der Zellkulturüberstand anschließend mittels Real-Time-PCR ausgewertet. In allen Proben konnte in der PCR Infektiöses-Bursitis-Virus detektiert werden.

4.2.4.2 Einfluss der Luftfeuchtigkeit

Die Untersuchungen am Virusaerosol fanden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % und ca. 85 % statt. Die Detektionsraten beider Geräte von infektiösem Virus sind in Abbildung 10 dargestellt.

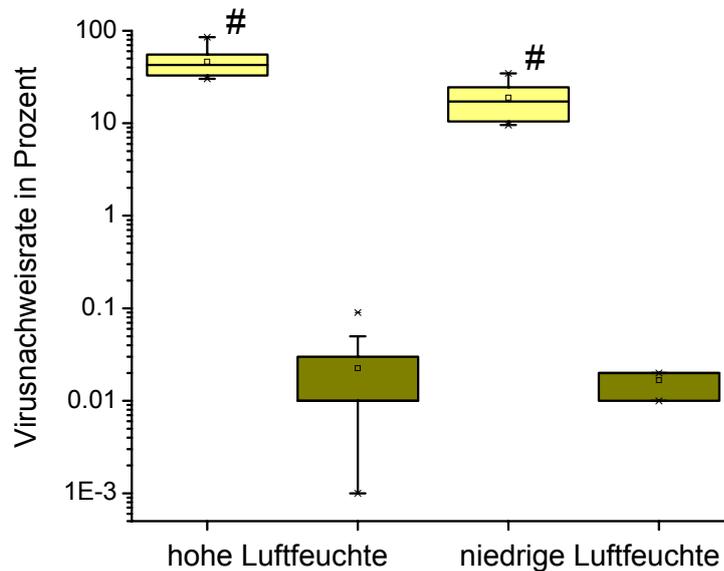


Abbildung 10: Prozentuale Sammeleffizienzen der beiden Sammelgeräte zum Nachweis von infektiösem IBDV aus experimentell erzeugtem Virusaerosol bei hoher (85 %) und niedriger (50 %) Luftfeuchtigkeit. Die hellgelben Boxen stellen die Ergebnisse für den Impinger dar, die dunkelgelben Boxen die des Filters. Die Virusquantifizierung erfolgte durch Titration in Zellkultur. # stellt signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Luftfeuchten bei Verwendung desselben Sammelgerätes dar. ($p < 0,05$; Mann-Whitney-Test)

Die Wiederfindungsrate von infektiösem IBDV, gesammelt mit dem Impinger, war bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ bei hoher Luftfeuchtigkeit signifikant höher als bei niedriger. Hinsichtlich der Virusdetektion mit Hilfe des Filters konnte kein signifikanter Unterschied bei verschiedenen Luftfeuchtigkeiten festgestellt werden. Auch bei Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR wurde bei keinem Geräte ein Unterschied zwischen den Luftfeuchten ermittelt.

4.2.5 Vergleich der Nachweisraten beider Testviren

Alle Detektionsraten beider eingesetzter Testviren, welche mit den verschiedenen Sammelgeräten und Nachweismethoden ermittelt wurden, wurden mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Proben miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 13: Vergleichende Darstellung der Detektionsraten beider Testviren. + steht für signifikanten Unterschied bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, - steht für keinen signifikanten Unterschied

Gerät und Methode zum Virusnachweis	geometrischer Mittelwert der Sam- meleffizienz mit geometrischer Standardabweichung		signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)
	NDV	IBDV	
Impinger			
<i>Hühnerei / Zellkultur</i>	4,0 % ×/ 1,7	31,8 % ×/ 1,8	+
<i>quant. PCR</i>	2,1 % ×/ 3,9	5,8 % ×/ 2,3	+
Gelatinefilter			
<i>Hühnerei / Zellkultur</i>	1,2 % ×/ 2,3	0,016 % ×/ 2,2	+
<i>quant. PCR</i>	22,3 % ×/ 3,1	36,1 % ×/ 3,4	-

4.2.6 Nachweisgrenzen der Sammelgeräte für die Virusdetektion aus der Luft

Zur Ermittlung der Nachweisgrenzen der beiden verwendeten Sammelgeräte mit den verschiedenen Methoden zum quantitativen Virusnachweis wurden verschiedene Verdünnungsstufen der verwendeten Virussuspensionen (10^{-1} bis 10^{-4}) vernebelt, Luftproben mit beiden Sammelgeräten entnommen und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 gezeigt.

Ergebnisse

Tabelle 14: Nachweisgrenzen des Impingers und Gelatinefilters bei der Detektion von NDV und IBDV aus experimentell erzeugtem Virusaerosol. Die zu vernebelnde Originalvirussuspension wurde mit verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. + steht für positiven Virusnachweis, - steht für negativen Virusnachweis, Ei = embryoniertes Hühnerei, ZK = Zellkultur

Verdünnungsstufe der Virus- suspension	berechneter Titer des Virusaerosols		Ergebnisse für die Testviren mit beiden Geräten und Nachweismethoden							
	NDV (in EID ₅₀ /m ³)	IBDV (in TCID ₅₀ /m ³)	NDV				IBDV			
			Impinger		Filter		Impinger		Filter	
			Ei	PCR	Ei	PCR	ZK	PCR	ZK	PCR
10 ⁻¹	10 ^{6,53}	10 ^{7,1}	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	10 ^{5,53}	10 ^{6,1}	+	-	-	+	+	+	-	+
10 ⁻³	10 ^{4,53}	10 ^{5,1}	-	-	-	-	+	-	-	+
10 ⁻⁴	10 ^{3,53}	10 ^{4,1}	-	-	-	-	-	-	-	-

Bei Verwendung des **Impingers** konnte infektiöses Newcastle-Disease-Virus durch Titration im embryonierten Hühnerei bis zu der Nachweisgrenze von 10^{5,53} EID₅₀ / m³ sicher nachgewiesen werden, bei Quantifizierung in der Real-Time-PCR bis zur Grenze von 10^{6,53} EID₅₀ / m³. Infektiöses-Bursitis-Virus wurde in Zellkultur bis zur Grenze von 10^{5,1} TCID₅₀ / m³ wiedergefunden, mittels der Real-Time-PCR bis zu 10^{6,1} TCID₅₀ / m³.

In den **Filter**proben wurde das NDV nur bis zu dem Aerosoltiter von 10^{6,53} EID₅₀ / m³ im embryonierten Hühnerei nachgewiesen. Durch die Real-Time-PCR war die Detektion noch bei einer weiteren Verdünnungsstufe, d.h. bis 10^{5,53} EID₅₀ / m³ positiv. Bei dem IBD-Virus konnte nur bei der ersten Verdünnung von 10⁻¹ (entspricht 10^{7,1} TCID₅₀ / m³) ein geringer Virustiter durch Titration in Zellkultur ermittelt werden. Der Virusgenomnachweis in der Real-Time-PCR jedoch war bis zu dem Aerosoltiter von 10^{5,1} TCID₅₀ / m³ sicher positiv.

Bei der Verdünnung der zu vernebelnden Virussuspension von 10⁻⁴ waren alle Proben negativ. Die ermittelten Virustiter pro m³ Luft aller Proben sind im Anhang (Tabelle 19) zu finden.

4.3 Aerogene Ausscheidung ausgewählter Impfviren unter experimentellen Bedingungen

4.3.1 Impfung gegen Newcastle Disease

4.3.1.1 Ergebnisse der Tupferproben

Ab dem 1. Tag nach Vakzinierung wurden täglich von 20 Tieren Rachen- und Kloakentupfer entnommen und wie in 3.6.3.1 beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

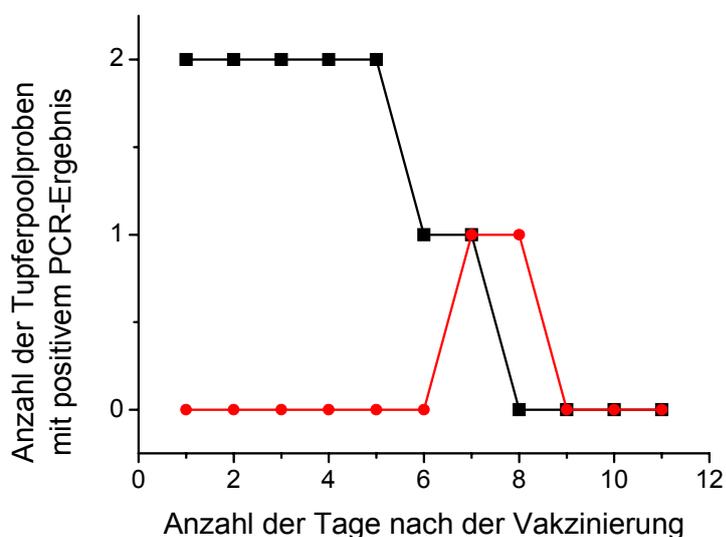


Abbildung 11: Untersuchung der Rachen- und Kloakentupfer (2 Tupferpoolproben aus jeweils 10 Tupfern) auf NDV Stamm LaSota mittels Real-Time-PCR. Die Ergebnisse der Rachentupferproben sind schwarz dargestellt, die der Kloakentupfer rot.

In den Tupferproben des Rachens konnte ab dem 1. Tag *p. vacc.* und bis zum 5. Tag das Virus in beiden Tupferpoolproben nachgewiesen werden. Am Tag 6+7 nach Vakzinierung war jeweils nur eine Tupferpoolprobe positiv, bevor ab Tag 8 kein Virus mehr in den Rachentupfern mittels PCR detektiert werden konnte. Die Kloakentupfer waren bis auf zwei Ausnahmen am Tag 7 und 8 nach der Impfung immer negativ.

4.3.1.2 Ergebnisse der Luftproben

Es wurden täglich Proben von Stall- sowie Abluft parallel mit Impinger und dem AirPort® MD8 genommen und mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Zu keinem Zeitpunkt konnte in Proben des Impingers Virusgenom gefunden werden. Bei Analyse der Filterproben des AirPort® MD8 wurde am Tag 4 und 5 *p.vacc.* Virusgenom detektiert und quantifiziert. Am 4. Tag nach der Impfung wurde in der Stallluft Virus mit einem Titer von

$10^{3,5}$ EID₅₀ / m³ nachgewiesen. Einen Tag später konnte das Impfvirus in der Stallluft mit einem Titer von $10^{4,3}$ EID₅₀ / m³ Luft und in der Abluft $10^{1,5}$ EID₅₀ / m³ gefunden werden.

4.3.1.3 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

Die Seren der insgesamt 50 Tiere wurden mit ELISA-Kits zwei verschiedener Hersteller jeweils am 8. Lebenstag und 21 Tage nach der Impfung untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind vergleichend in Abbildung 12 aufgezeigt.

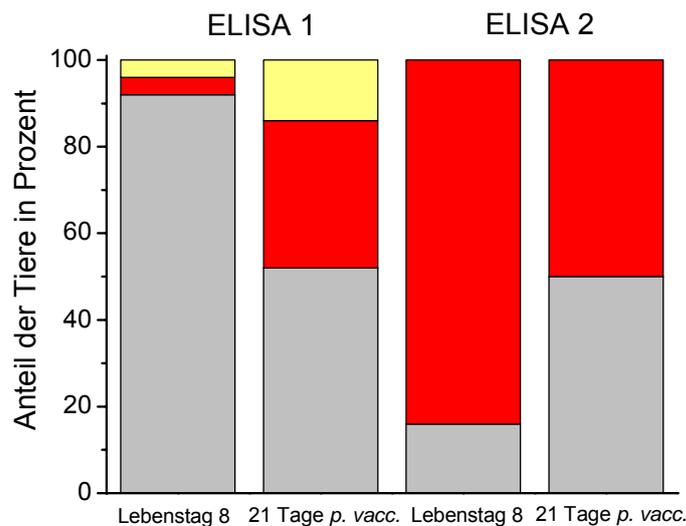


Abbildung 12: Untersuchung der Seren von Lebenstag 8 und 21 p.vacc. auf Antikörper gegen NDV mit zwei verschiedenen ELISA-Kits. Der Anteil der Tiere mit negativem Antikörpertiter ist grau dargestellt, der mit positiven Antikörpertiter rot und der Anteil mit zweifelhaftem Ergebnis hellgelb.

Bei Verwendung des ELISA-Kits 1 (FLOCKTYPE[®] recNDV) waren über 90 % der Tiere am 8. Lebenstag negativ auf Antikörper gegen NDV getestet wurden. 21 Tage nach der Impfung war der Anteil der Tiere mit positivem Antikörpertiter gegen das Impfvirus mit 52 % signifikant erhöht.

Der ELISA-Kit 2 (Flockcheck[®] NDV) ergab für die Untersuchung der Seren vom 8. Lebenstag signifikant unterschiedliche Ergebnisse als ELISA-Kit 1. So reagierten 84 % der Seren positiv auf Antikörper gegen NDV. Im Gegensatz dazu war dieser Anteil der Tiere mit positivem Antikörpertiter 21 Tage nach der Impfung mit 50 % signifikant erniedrigt.

4.3.2 Impfung gegen Infektiöse Bursitis

4.3.2.1 Ergebnisse der Tupferproben

Zur Kontrolle der Impfvirusausscheidung wurden nach Vakzinierung auch hier täglich von 20 Tieren Rachen- sowie Kloakentupfer genommen und jeweils 10 Proben gepoolt. Die Ergebnisse der Auswertung dieser Tupferpoolproben in der Real-Time-PCR sind in Abbildung 13 gezeigt.

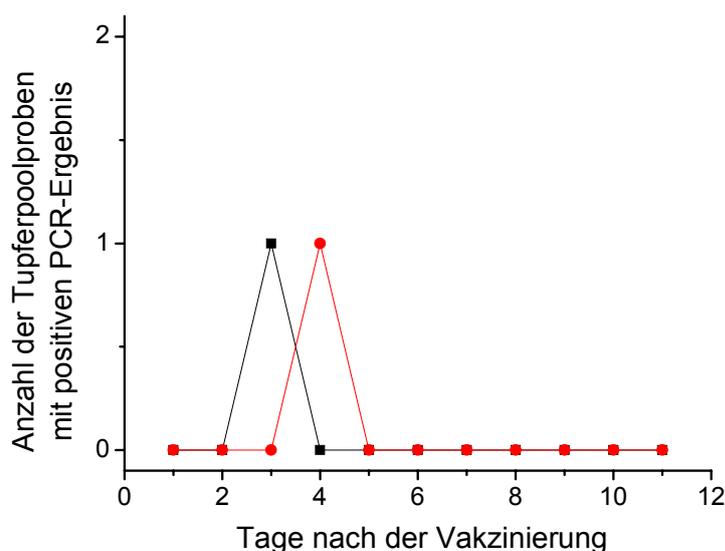


Abbildung 13: Untersuchung der Rachen- und Kloakentupfer (2 Tupferpoolproben aus jeweils 10 Tupfern) auf IBDV mittels Real-Time-PCR. Die Ergebnisse der Rachentupferproben sind schwarz dargestellt, die der Kloakentupfer rot.

Über den gesamten Probennahmezeitraum wurde nur jeweils in einer Rachentupferpoolprobe (Tag 3) und einer Kloakentupferpoolprobe (Tag 4) Virusgenom detektiert.

4.3.2.2 Ergebnisse der Luftproben

In den Proben der Stall- sowie Abluft konnte zu keinem Zeitpunkt und mit keinem der beiden Sammelgeräte Virus mittels Real-Time-PCR nachgewiesen werden.

4.3.2.3 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

Die Seren aller Tiere wurden vor und nach Vakzinierung auf Antikörper gegen IBDV untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Sie zeigen, dass vor der Impfung am 8. Lebenstag keines der Tiere einen positiven Antikörpertiter aufwies. Überdies reagierte 21 Tage nach Vakzinierung das Serum von nur einem Tier positiv und von 4 Tieren zweifelhaft. Alle anderen Hühner zeigten keine positiven Antikörpertiter gegen IBDV im verwendeten ELISA-Test.

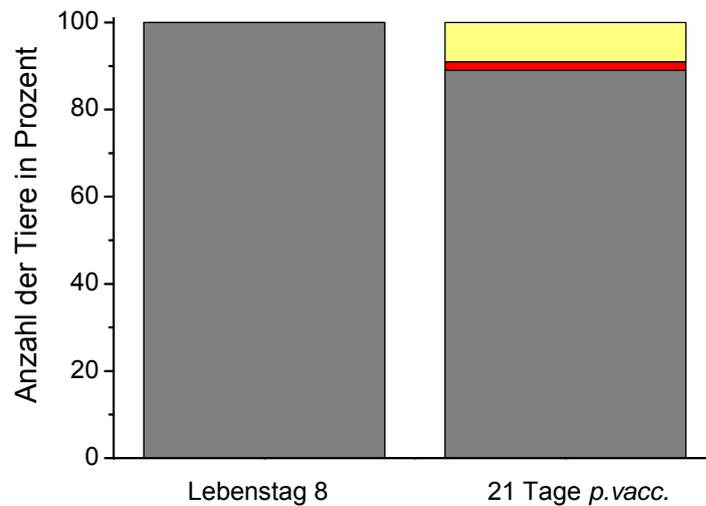


Abbildung 14: Untersuchung der Seren von Lebenstag 8 und 21 p.vacc. auf Antikörper gegen IBDV. Der Anteil der Tiere mit negativem Antikörpertiter ist grau dargestellt, der mit positivem Antikörpertiter rot und der Anteil mit zweifelhaftem Ergebnis hellgelb.

4.4 Aerogene Ausscheidung ausgewählter Impfviren in konventionellen Geflügelhaltungen

4.4.1 Impfung gegen Newcastle Disease

Es wurden zehn Ställe aus zwei Betrieben auf das Vorkommen des Impfvirus NDV Stamm LaSota untersucht. Dazu wurden Rachtupferproben, Luftproben sowie Blutproben zur serologischen Untersuchung entnommen. Des Weiteren wurde bei jeder Probenentnahme Lufttemperatur und –feuchte protokolliert.

4.4.1.1 Lufttemperatur und relative Luftfeuchtigkeit

Bei jeder Probenentnahme wurde Temperatur sowie die relative Luftfeuchtigkeit im Stall dokumentiert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Lufttemperatur und relative Luftfeuchtigkeit der beprobten Ställe in Betrieb 1 und 2.

Zeitpunkt der Luftprobenentnahme	Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit der untersuchten Ställe in:	
	Betrieb 1	Betrieb 2
4 bzw. 6 Tage nach der ersten Vakzinierung	20 - 22 °C, 71 - 85 %	22 - 26 °C, 55 - 75 %
4 bzw. 6 Tage nach der zweiten Vakzinierung	17 - 19 °C, 70 - 85 %	16 - 23 °C, 60 - 80 %

4.4.1.2 Rachentupferproben

In Betrieb 1 und 2 wurde wie schon in 3.7.2 beschrieben Rachentupfer entnommen und mit Hilfe der Real-Time-PCR ausgewertet. In keiner der Tupferpoolproben konnte dabei Virus nachgewiesen werden.

4.4.1.3 Ergebnisse der Luftproben

In verschiedenen Ställen wurden mehrere Luftproben 4 bis 6 Tage nach der Impfung mit AviPro® ND LASOTA gesammelt und untersucht. In keiner Luftprobe konnte ein positives Ergebnis in der Real-Time-PCR erzielt werden.

4.4.1.4 Untersuchung der Seren im ELISA

In beiden Betrieben wurden jeweils 4 Tage nach der ersten Impfung (am 18. Lebenstag) und 4 Tage nach der zweiten (am 60. Lebenstag) stichprobenartig Blut entnommen. Die Seren wurden mittels eines ELISA-Kits auf Antikörper gegen NDV untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

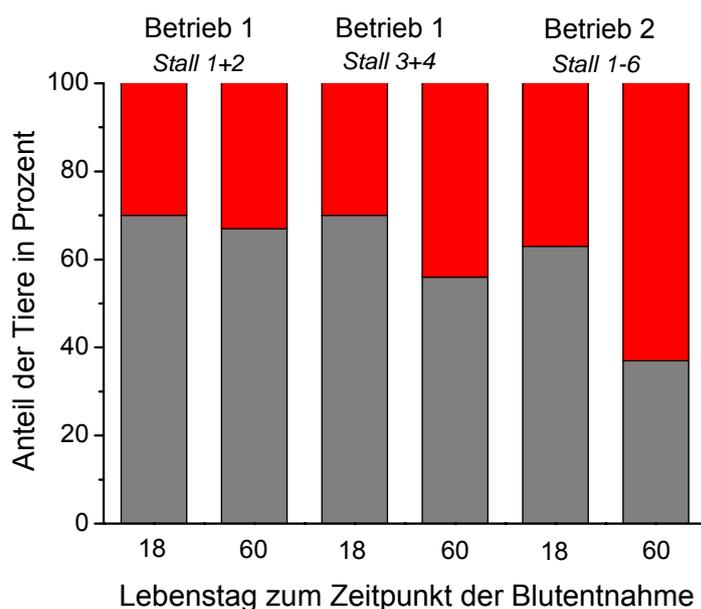


Abbildung 15: Stichprobenartige Untersuchung von Geflügelsen auf Antikörper gegen NDV aus zwei Betrieben mit konventioneller Haltung am Lebensstag 18 und 60. Im Betrieb 1 *Stall 1+2* und Betrieb 2 *Stall 1-6* erfolgten die erste und zweite Vakzinierung via Trinkwasser, im Betrieb 1 *Stall 3+4* die erste Impfung als Sprayimpfung und die zweite via Trinkwasser. Der Anteil der Tiere mit negativem Antikörpertiter ist grau dargestellt, der mit positivem Antikörpertiter rot.

Es ist ersichtlich, dass sowohl zu dem frühen Probennahmezeitpunkt (am 18. Lebensstag) als auch zu dem späteren Zeitpunkt (am 60. Lebensstag) Tiere mit positiven Antikörpertitern vorhanden sind. In allen Ställen jedoch nimmt der Anteil an Tieren mit positiven Antikörpertitern im Laufe der Zeit tendenziell zu. Auf Grund der kleinen Stichprobenanzahl in Betrieb 1 wurden die ELISA-Ergebnisse von Stall 1 bis 4 für die statistische Auswertung zusammengefasst. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Antikörpertitern vom 18. und 60. Lebensstag. Im Betrieb 2 jedoch lies sich eine signifikante Erhöhung von antikörperpositiven Tieren im Verlauf der Zeit ermitteln.

4.4.2 Impfung gegen Infektiöse Bursitis

In zehn Ställen aus einem Betrieb wurden 4 bis 6 Tage nach der Vakzinierung gegen IBDV jeweils eine Luftprobe von 1000 l entnommen. Die Lufttemperatur in allen Ställen betrug zwischen 24 und 28 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 65 - 75 %. Die Impfung erfolgte mit dem Infektiösen-Busitis-Virus *Stamm Cu-IM*. Filterproben wurden mittels Real-Time-PCR analysiert. In keiner Probe wurde dabei Virus nachgewiesen.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Sammelmethode auf ihre Eignung zum Nachweis luftgetragener Viren untersucht. Diese grundlegenden Untersuchungen wurden an experimentell erzeugten Virusaerosolen in einer Aerosolkammer durchgeführt. Die vergleichenden Analysen der Sammelgeräte erfolgten anhand zweier Geflügelviren, dem Newcastle-Disease-Virus und Infektiöse-Bursitis-Virus. Dabei stellt das NDV ein Modell für ein Geflügelvirus mit allgemein geringerer Tenazität und das IBDV für eines mit hoher Tenazität dar. Es wurden verschiedene Methoden zum quantitativen Virusnachweis aus Luftproben entwickelt und verglichen. Weiter umfasste diese Arbeit lufthygienische Untersuchungen zur aerogenen Ausscheidung ausgewählter Geflügelimpfviren (NDV und IBDV) nach Vakzinierung der Tiere.

5.1 Untersuchungen an experimentell erzeugten Virus-aerosolen

Zwei Sammelgeräte, der Impinger AGI-30 und der Gelatinefilter, wurden hinsichtlich ihrer Effizienz zum Virusnachweis aus Luftproben untersucht. Dazu wurden Aerosole aus Newcastle-Disease-Virus und Infektiöse-Bursitis-Virus generiert.

5.1.1 Etablierung von Methoden zum quantitativen Virusnachweis aus Luftproben

Um eine Effizienz der Geräte zum Nachweis von infektiösen Viren bzw. Virusgenom ermitteln zu können, war eine genaue Quantifizierung der Viren im Probenmaterial notwendig.

5.1.1.1 Nachweis von infektiösem Virus

Newcastle-Disease-Virus

Die Quantifizierung des infektiösen NDV aus den mittels der verschiedenen Geräte gesammelten Luftproben erfolgte in embryonierten Hühnereiern mit der Methode nach Reed und Muench (REED u. MUENCH 1938). Dabei waren die viruspositiven Embryonen, welche infolge der Probeninokulation verstarben, eindeutig von den virusnegativen unterscheidbar. Die stichprobenartig mittels Real-Time-PCR auf NDV LaSota untersuchten Allantoisflüssigkeiten von Eiern mit viruspositiv gewerteten Embryonen bestätigten die Ergebnisse. Diese Vorgehensweise empfiehlt auch das Friedrich Löffler Institut in der amtlichen Methodensammlung für anzeigepflichtigen Tierseuchen vom März 2009 (FRIEDRICH LÖFFLER INSTITUT 2009). In der Vergangenheit wurde dazu oft der weniger spezifische Hämagglutinationstest angewandt (LUTZ et al. 1984).

Embryonen, welche als Negativkontrolle mit virusfreier Flüssigkeit beimpft wurden, zeigten keine Veränderungen. Die angewandte Methode der Virustitration im Ei ist somit sehr gut zum Nachweis des NDV aus den verschiedenen Luftproben geeignet.

Auch Versuche der Titration von lentogenen Stämmen des NDV in Zellkultursystemen waren in anderen Studien erfolgreich, jedoch erwies sich die Methode in embryonierten Hühnereiern stets als sensitiver (LOMNICZI 1974, WAMBURA et al. 2006).

Infektiöse-Bursitits-Virus

Zur Virustitration wurde die permanente Zelllinie aus Buffalo-Green-Monkey-Zellen verwendet (JACKWOOD et al. 1987). In der Vergangenheit wurden dafür vor allem primäre Zelllinien (LUKERT u. DAVIS 1974) oder auch embryonierte Hühnereier verwandt (MÜLLER et al. 2003). Die Titration in primären Hühnerembryofibroblasten wurde auch in dieser Arbeit erfolgreich getestet. Jedoch wies diese primäre Zellkultur keine wesentlichen Vorteile gegenüber der permanenten auf und so fiel die Entscheidung auf die arbeits- und zeitsparendere Verwendung der permanenten BGM-Zelllinie.

5.1.1.2 Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR

Neben dem Nachweis der infektiösen Viren erfolgte auch die Quantifizierung des Virusgenoms in den Luftproben. Dafür wurde die quantitative Real-Time-PCR ausgewählt, da es sich hierbei um ein Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität handelt. Hinzu kommt, dass die Schritte der Nukleinsäureamplifikation, PCR-Produkt-Detektion und Quantifizierung in einem geschlossenen System ablaufen. Dies hat neben der Schnelligkeit den Vorteil der Kontaminationsvermeidung. Zudem vereinfacht bzw. ermöglicht sie die Untersuchung der Proben auf Viren, für welche bisher kein geeignetes Zellkultursystem existiert (WILLEKE 1998).

Die beiden Schritte der Nukleinsäureisolierung sowie der reversen Transkription, welche vor der quantitativen PCR erfolgen, sind dabei von großer Wichtigkeit. Deshalb wurde aus drei kommerziellen Kits der QIAmp[®] Viral RNA Mini Kit ausgewählt, da dieser am besten zur RNA-Isolierung aus den verschiedenen Probenflüssigkeiten (Zellkulturüberstand, Virus aufgelöst in PBS, Impingersammelflüssigkeit und verflüssigter Gelatinefilter) geeignet war. Auch HERMANN et al. (2007) verwendeten diesen Kit zur Bearbeitung von Impingerproben. Um Verluste durch Lagerung der RNA zu vermeiden, wurde die gewonnene RNA zügig in cDNA umgeschrieben, da cDNA stabiler und somit länger lagerfähig ist als RNA (BUSTIN 2000).

Es wurde das Prinzip der relativen Quantifizierung mit Normalisierung aller Proben angewandt. Dies wurde zur Analyse von Luftproben in der vorliegenden Arbeit erstmals auf diese Weise durchgeführt und konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Bisher führte man vor

allem Quantifizierungen ohne Normalisierung der Proben mit Hilfe einer Standardkurve durch (FABIAN et al. 2008, HERMANN et al. 2007, DEE et al. 2005, CHO et al. 2006, QUAN et al. 2004, HIETALA et al. 2005). In dieser Arbeit wurde FCV als Referenzgen zur Normalisierung der Proben und Calibratoren verwendet. Durch Hinzugabe einer konstanten Menge an FCV vor der RNA-Isolierung, wurden unterschiedliche Effizienzen der Nukleinsäureisolierung sowie der reversen Transkription ausgeglichen. Anhand des Vergleichs mit einer Calibratorprobe bekanntem Titer, welche für alle Proben eines Testvirus dieselbe war, ließ sich so der absolute Wert des Virustiters der unbekannt Probe leicht und wesentlich verlässlicher errechnen.

Für jedes zu quantifizierende Zielgen und für das Referenzgen wurden spezifische Primerpaare entworfen und mittels Schmelzkurvenanalyse getestet, wobei keine unspezifischen PCR-Produkte, wie z.B. Primerdimere, welche die Effektivität der PCR reduzieren können (BEJ et al. 1991), festgestellt wurden. Durch den Einsatz von TaqMan[®]-Sonden wurde eine hohe Spezifität der PCR garantiert (WALKER 2002). Alle Reaktionen konnten so optimiert werden, dass die erforderliche Effizienz von 95 - 100 % für die Quantifizierung mittels Real-Time-PCR für jede Reaktion erreicht wurde. Die Effizienz wurde mit der Standardkurvenmethode ermittelt. Trotz identischer Ziel-DNA in den Standardverdünnungen und in den Luftproben, können die wahren Effizienzen der Reaktionen der Aerosolproben auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Probenflüssigkeit und eventuell enthaltender Inhibitoren abweichen (MEIJERINK et al. 2001, KÜHNE u. OSCHMANN 2002, ZENG et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit jedoch, wirken diese hemmenden Faktoren, durch Normalisierung der Proben, theoretisch auf die PCR des Ziel- und Referenzgens gleichermaßen ein und werden somit verrechnet. Deutlich wird dies in Abbildung 22, in welcher die Amplifikationskurven des FCV mehrerer Luftproben sowie des Calibrators dargestellt sind. Das Referenzgen wurde zu jeder Probe in gleicher Menge zugesetzt und müsste somit theoretisch überall den gleichen C_T -Wert besitzen. Dies ist jedoch nicht der Fall, was auf die oben genannten Gründe zurückzuführen ist. Diese Abweichungen werden dann bei der Normalisierung der Proben berücksichtigt. Damit werden die Ergebnisse der Quantifizierung in der Real-Time-PCR realistischer und die Genauigkeit somit verbessert (PFAFFL 2004).

5.1.2 Vergleich der Effizienzen der Sammelgeräte

Die Effizienzen von Impinger AGI-30 und Gelatinefilter zur Virusisolierung aus der Luft wurden an experimentellen Virusaerosolen aus NDV und IBDV untersucht. Dabei wurde ein identisches Volumen einer Luftprobe mit beiden Geräten simultan und mit gleicher Geschwindigkeit entnommen. Dies ist für einen genauen und direkten Vergleich der Geräte notwendig (MAYR 2002, HERMANN et al. 2006), wurde jedoch in der Literatur nicht immer beachtet. So

verglichen TSENG u. LI (2005) die Effizienzen vier verschiedener Sammelgeräte, welche jedoch alle ein unterschiedliches Probenvolumen aus dem Aerosol entnahmen. BOURGUEIL et al. (1992a) verglichen einen Zyklon-Sammler und die Sedimentationsmethode, wobei die Beprobungszeit mit beiden Verfahren um den Faktor 4 variierte und man zudem bei der Sedimentation kein Luftvolumen zuordnen kann.

Zum Vergleich verschiedener Sammelmethoden ist eine Quantifizierung der Keime aus den Luftproben unerlässlich. In der dieser Arbeit wurde hierzu zum einen infektiöses Virus und zum anderen Virusgenom quantifiziert.

5.1.2.1 Nachweis infektiöser Viren

Die beiden Sammelgeräte wurden auf ihre Effizienz zur Isolierung von infektiösen Viren aus Luftproben untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass mit dem Impinger die Nachweisrate signifikant höher war als mit dem Gelatinefilter. Die Sammeleffizienz des Impingers für beide Testviren wiederum ist jedoch signifikant unterschiedlich (Tabelle 13). Für NDV beträgt der geometrische Mittelwert 4 %, für IBDV 31,8 %. Dies ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf den Virusaufbau zurückzuführen. Das Newcastle-Disease-Virus besitzt eine Lipidhülle und ist somit allgemein labiler (ZEE u. MACLACHLAN 2004). Wahrscheinlich wird diese Hülle sehr leicht durch den Sammelprozess des Impingers beschädigt, wodurch das Virus seine Infektiosität verliert. Diese Vermutung bestätigen auch die Ergebnisse der Vorversuche mit verschiedenen Sammelflüssigkeiten (Kapitel 4.2.2.1). Dabei wurden nach 20-minütiger Betriebszeit des Impingers nur zwischen 8,5 % und 28,4 % der theoretisch möglichen Menge an NDV wieder gefunden. GRINSHPUN et al. (2007) erklärt den Infektiositätsverlust der Mikroorganismen durch Sammelstress infolge Impaktion gegen die Glaswand des Impingers. Weiter ist durch die extreme Flüssigkeitsbewegung ein „reentrainment“ schon gesammelter Keime möglich. LIN et al. (2000) spekulieren, dass hydrophobe Partikel, wie auch behüllte Viren, besonders leicht von der Flüssig- in die Gasphase übertreten würden. Für das zweite Testvirus (IBDV) hingegen, konnte in den Vorversuchen zwischen 66,3 % und 89,5 % nachgewiesen werden. Dieses Virus besitzt keine Hülle, hat eine hohe Tenazität (MÜLLER et al. 2003) und ist somit weniger stressanfällig bei der Sammlung mit dem Impinger. Hinzu kommt der Einfluss des Suspensionsmediums der zu vernebelnden Viren. Dabei wirken proteinhaltige Medien schützend (DUBOVI u. AKERS 1970) und erhöhen die Effizienzen der Sammelgeräte. TROUWBORST u. WINKLER (1972b) schreiben vor allem den apolaren Aminosäuren die größte protektive Wirkung zu. Auch Zugabe von Salzen zum Suspensionsmedium kann eine schützende Wirkung haben (BENBOUGH 1971). Die protektive Wirkung der Proteine wurde auch speziell für das NDV-Virus Stamm LaSota nachgewiesen (LUTZ et al. 1984). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war das IBDV in Zellkulturmedium mit 10 % FKS suspendiert, NDV dagegen in

PBS. Somit könnte IBDV im Aerosol besser vor einer Inaktivierung geschützt worden sein als NDV. Zusätzlich wurde die schützende Wirkung von Proteinen im Sammelmedium des Impingers bei der Auswahl der Sammel Flüssigkeit berücksichtigt. Mit beiden Viren wurden in Vorversuchen Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Proteingehalt getestet und diese mit den besten Virusnachweisraten ausgewählt. Bei dem unbehüllten IBDV waren die Nachweisraten für die verschiedenen Flüssigkeitszusammensetzungen ähnlich, so dass die Wahl auf PBS fiel. Jedoch muss angemerkt werden, dass die Testvirussuspension, welche zu der jeweiligen Flüssigkeit hinzu gegeben wurde einen Proteingehalt von 10 % aufwies und somit auch das Sammelmedium eine geringe Proteinkonzentration von ca. 0,3 % enthielt.

Bei NDV wirkte sich ein Proteinzusatz zum Sammelmedium positiv auf die Viruswiederfindungsrate aus. Dies wird durch Untersuchungen von STOLZE u. KAADEN (1989) bestätigt. HERMANN et al. (2006) hingegen fanden PBS ohne Proteinzusätze, dafür mit Ethylenglycol, als das am besten geeignete Sammelmedium für das behüllte PRRS-Virus heraus. Für alle folgenden Versuche der vorliegenden Arbeit wurde PBS + 1 % FKS verwendet. Zur Verhinderung der starken Schäumung wurde Olivenöl hinzugesetzt. Bei dieser Zusammensetzung war allerdings die Sterilfiltration der Probenflüssigkeit stark erschwert und es mussten immer mehrere Sterilfilter verwendet werden.

Im Vergleich zu den prozentualen Detektionsraten der Vorversuche waren diese bei den experimentellen Aerosolen dann geringer. Dies lässt sich vor allem mit den physikalischen Verlusten durch Sedimentation einiger Aerosolpartikel innerhalb der Aerosolkammer bzw. auf dem Weg zum Sammelgerät begründen (IJAZ et al. 1987, HERMANN et al. 2007).

Mit Hilfe des Gelatinefilters konnten bei beiden Testviren nur sehr geringe Virusnachweisraten von 1,2 % (NDV) und 0,016 % (IBDV) festgestellt werden. Der verwendete Filter hatte eine Porengröße von etwa 3 µm. Jedoch werden die Partikel in seiner vernetzten Tiefenstruktur sehr gut durch ihre Trägheit, Diffusion und elektrostatische Anziehung zurückgehalten (GRINSHPUN et al. 2007). Dies bestätigten auch BURTON et al. (2007), die eine physikalische Sammeleffizienz von > 96 % für Gelatinefilter mit gleicher Porengröße ermittelten. Dabei wurde die Partikelanzahl in der Luft vor und nach Passage des Filters gemessen. Die niedrigen Sammeleffizienzen für infektiöse Viren sind demnach wahrscheinlich auf mechanische Beschädigung der Viren durch den Sammelstress und Austrocknung zurückzuführen (WANG et al. 2001).

In der Literatur sind für die Effizienzen von Impingern und Gelatinefiltern zur Sammlung verschiedener Viren aus künstlichen Aerosolen stark voneinander abweichende Angaben zu finden (Tabelle 16).

Diskussion

Tabelle 16: Ergebnisse anderer Studien zu Effizienzen von Impingern und Filtern für den Nachweis infektiöser Viren aus experimentell generierten Aerosolen. nLF = niedrige Luftfeuchtigkeit, mLF = mittlere Luftfeuchtigkeit, hLF = hohe Luftfeuchtigkeit

Sammelgerät	Testkeim	Geräteeffizienz	Quelle
Impinger	Rhinovirus	0,25 % bei nLF / mLF 30 % bei hLF	KARIM et al. (1985)
	Poliovirus	9 % bei hLF kein Nachweis bei nLF / mLF	IJAZ et al. (1985)
	Bovines Rotavirus	max. 74 % bei mLF	IJAZ et al. (1994)
	MS2, phi x174, T7, phi6	0,01 % - 3 %	TSENG u. LI (2005)
	Yellow-Fever-Virus	ca. 1 - 3 %	MAYHEW et al. (1968)
Gelatinefilter	MS2, phi x174, T7, phi6	0,1 % - 6 %	TSENG u. LI (2005)
	KSV	max. 2,2 %	WEESENDORP et al. (2008)
Nitrocellulose- filter	NDV	1 %	LANDMAN u. VAN ECK (2001)

Im Kontrast zu diesen Ergebnissen ermittelten HAFERKORN et al. (1968) und JASCHOF (1992b) eine relative Effektivität des Gelatinefilters von 74 % bzw. 200 % und 400 % im Vergleich zum Impinger. Die Autoren machen jedoch keine Angaben bezüglich der absoluten Effizienzen der Geräte zur Isolierung von infektiösem Virus aus Luftproben.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit sowie die aus Tabelle 16 zeigen, dass die Effizienz des Gelatinefilters stets in einem relativ niedrigen, einstelligen Prozentbereich liegt und die des Impingers zwischen den verschiedenen Studien sehr stark schwankt. Die Sammeleffizienzen scheinen von sehr vielen Faktoren beeinflusst zu werden. Neben dem verwendeten Testkeim, der relativen Luftfeuchtigkeit, Temperatur oder das Suspensionsmedium, ist die mögliche Wiederfindungsrate von vernebelten Viren auch von der gesamten Apparatur abhängig. So wird ein Virus bei Vernebelung mit verschiedenen Düsen unterschiedlich stark inaktiviert (ADAMS et al. 1982). Weiter ist die von der Düse erzeugte Tröpfchengröße für die Stabilität des Aerosols und

somit den Virusnachweis von großer Bedeutung (SATTAR u. IJAZ 2007). Der Aufbau der Apparatur, bei welcher es sich um ein statisches Aerosol oder um ein dynamisches handeln kann, ist auch zu berücksichtigen. Weiter ist zu beachten, dass bei der Methode der Filtration auch der verwendete Sammelkopf die Effizienz beeinflussen kann. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Sammelköpfe (z.B. GSP, IOM, CIS), welche Filter verschiedener Größe verwenden. Dies alles erschwert den Vergleich verschiedener Studien und muss bei der Datenbewertung berücksichtigt werden. Dennoch ist insgesamt der Impinger für den Nachweis von infektiösen Viren aus Aerosolen als besser geeignet einzuschätzen als der Gelatinefilter.

Einfluss der Luftfeuchtigkeit

Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die biologische Stabilität von Viren wurde von verschiedenen Wissenschaftlern untersucht (BENBOUGH 1971, MOE u. HARPER 1983, HERMANN et al. 2007). Vor allem die Virusmorphologie beeinflusst demnach die Reaktion auf die unterschiedlichen Luftfeuchten, wobei die Virushülle dabei von besonderer Bedeutung ist. Behüllte Viren besitzen im Allgemeinen eine höhere Stabilität bei niedrigeren Luftfeuchten, wie z.B. DONALDSON u. FERRIS (1976) und HERMANN et al. (2007) in Experimenten mit verschiedenen behüllten Viren zeigten. Viren ohne Hülle dagegen sind meist bei hohen Luftfeuchtigkeiten stabiler (ADAMS et al. 1982, BOURGUEIL et al. 1992a, IJAZ et al. 1994, MOHR 2007). Deshalb wurden die Experimente in dieser Arbeit bei zwei unterschiedlichen relativen Luftfeuchtigkeiten durchgeführt, einer hohen von 85 % und einer niedrigeren von 50 %. Bei dem niedrigeren Wert von 50 % handelt es sich eigentlich um eine mittlere Luftfeuchte, da in der Natur selbstverständlich weitaus trockenere Luft vorkommt. In Geflügelställen der konventionellen Broilerhaltungen, welche auch in den Feldstudien der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, liegt die relative Luftfeuchte jedoch zwischen 50 % und 80 % (HOY et al. 2006). Hinzu kommt, dass für die Erzeugung des künstlichen Aerosols mit einer sehr niedrigen Luftfeuchte in der hier verwendeten Apparatur nur sehr wenig Virussuspension pro Luftvolumen hätte vernebelt werden können. Dadurch wäre der Virustiter im Aerosol im Vergleich zu der sehr hohen Luftfeuchtigkeit viel geringer gewesen und ein Vergleich schlechter möglich.

Die Ergebnisse für das Newcastle-Disease-Virus zeigen, dass die Virusnachweisraten mit dem Filter signifikant und mit dem Impinger tendenziell bei der niedrigeren Luftfeuchte höher waren als bei der höheren (Abbildung 8). Bestätigt wird dies durch KOURNIKAKIS et al. (1987), die für NDV Stamm LaSota die höchste Stabilität des Virus bei niedriger Luftfeuchtigkeit von 20 - 30 % in Kombination mit einer niedrigen Temperatur von 10 °C beschreiben. Die Untersuchungen zum Infektiösen-Bursitis-Virus ergaben bei Sammlung mit dem Impinger signifikant höhere Virusnachweisraten bei der höheren Luftfeuchtigkeit. Dieses Ergebnis deckt sich

mit Resultaten weiterer Studien, in denen verschiedene andere unbehüllte Viren auch eine höhere Stabilität bei hohen Luftfeuchtigkeiten zeigten (HATCH u. WARREN 1969, DONALDSON u. FERRIS 1976, BENBOUGH 1971, ADAMS et al. 1982). In Untersuchungen von KARIM et al. (1985) unterscheidet sich die Virusnachweisrate bei den verschiedenen Luftfeuchten viel deutlicher als bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten. Sie fanden infektiöses Rhinovirus bei niedriger Luftfeuchtigkeit nur zu 0,25 %, bei hoher bis fast 30 % wieder. Dies könnte auch an der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Apparatur liegen, bei welcher ständig neue Virussuspension vernebelt wird und somit die vorherrschende Luftfeuchtigkeit auf die Viruspartikel nur während ihrer Passage durch die Kammer für einige Minuten einwirkt. Für das IBDV speziell sind in der Literatur keine anderen Untersuchungen zu dieser Thematik vorhanden.

TROUWBORST et al. (1974b) erklären die Inaktivierung von Viren durch eine bestimmte vorherrschende Luftfeuchtigkeit mit der Adsorption derer an der Grenzfläche Luft/Wasser und der Tendenz ihrer Hüllproteine zur Entfaltung. Dieser Adsorptionsschritt ist abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit der Viren. Hydrophobe Partikel adsorbieren schlechter an diese Grenzfläche und würden sich vor allem in der Luftphase befinden. Die daraus resultierende starke Oberflächenspannung zwischen Virus und Luft kann zur Inaktivierung des Viruspartikels führen. Behüllte Viren können durch den beschriebenen Prozess besonders leicht inaktiviert werden, da ihre Lipidhülle die hydrophobe Natur der Virusoberfläche und somit die Proteinveränderungen verstärken. Viele unbehüllte Viren (wie MKS-Virus, Swine vesicular disease virus, Vesicular exanthema virus, Equines Rhinovirus 1, Bovines Adenovirus 1) hingegen, wurden bei trockener Luftfeuchte inaktiviert (DONALDSON u. FERRIS 1976). Dies wird auf Austrocknung durch Entzug von essentiellen Wassermolekülen aus dem Capsid (DONALDSON u. FERRIS 1976, STÄRK 1999) oder auf strukturelle Neuarrangements von Capsidproteinen durch Rehydrierung bei der Sammlung (BENBOUGH 1971) zurückgeführt.

Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse stellten HUGH-JONES et al. (1973) bei Wildtypen des NDV eine bessere Stabilität bei besonders hohen Luftfeuchtigkeiten fest. Und für die unbehüllten Rhinoviren z.B. wurde sowohl bei sehr hohen als auch bei niedrigen Luftfeuchtigkeiten eine hohe Stabilität ermittelt (KARIM et al. 1985).

Schlussfolgernd ist unter Einbezug der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse nur eine Tendenz des Einflusses der relativen Luftfeuchte auf die Stabilität der Viren im luftgetragenen Zustand zu erkennen: behüllte Viren scheinen stabiler bei niedrigen Luftfeuchtigkeiten, unbehüllte bei hohen Luftfeuchtigkeiten. Jedoch haben noch viele andere Faktoren, wie das Suspensionsmedium der zu vernebelnden Viren (BENBOUGH 1971), das Sammelmedium, Temperatur (HERMANN et al. 2007) oder Bearbeitung der Proben (TSENG u. LI 2005) Einfluss auf die

Infektiösität der Viren bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten in experimentell generierten Aerosolen.

5.1.2.2 Nachweis des Virusgenoms

Die Ergebnisse zeigen, dass in den Versuchen mit beiden Testviren und beiden Sammelmethode Virusgenom in der Real-Time-PCR gefunden und quantifiziert werden konnte. In den Proben des Gelatinefilters allerdings, konnte signifikant mehr Virusgenom detektiert werden als in denen des Impingers. Die Virusnachweisraten in den Impingerproben liegen mittels PCR (NDV 2,1 %, IBDV 5,8 %) sogar noch unter denen mittels Titration im embryonierten Hühnerei bzw. Zellkultur (NDV 4 %, IBDV 31,8 %). Daher ist eine Hemmung der PCR der Impingerproben zu vermuten. Dies ist vor allem in Umweltproben ein bekanntes Phänomen (ZENG et al. 2004). Die Inhibition kann durch Störungen des Mikroorganismenaufschlusses, schlechte Nukleinsäureisolierung, Hemmung der Polymerase oder auch durch Abbau von Nukleinsäuren zustande kommen (ABU AL-SOUD u. RÅDSTRÖM 1998, WILSON 1997, PECCIA u. HERNANDEZ 2006). Ob bestimmte Substanzen der Impingerflüssigkeit für eine Hemmung verantwortlich sein könnten, lässt sich nur vermuten. Prinzipiell werden bei der Sammlung Schadgase und Staub in die Impingerflüssigkeit ausgewaschen, wovon eine inhibierende Wirkung ausgehen könnte. In der Ausgangsflüssigkeit des Sammelgerätes befanden sich Salze und bei der Sammlung von NDV zusätzlich noch Protein sowie Olivenöl. Sowohl Proteine (HERMANN et al. 2006) als auch Salze (WILSON 1997) wurden als hemmende Substanzen identifiziert. KREADER (1996) hingegen konnte keine inhibierende Wirkung von Proteinen auf die PCR nachweisen. Auch die Filterproben enthalten durch ihren extrem hohen Gehalt an Gelatine sehr viel Protein. Bei dem Vergleich der C_T -Werte des endogenen Referenzgens (VP1 von FCV) in Proben des Impingers mit denen des Gelatinefilters (Abbildung 22) ist eine in allen Proben wiederkehrende Abweichung auffällig. Die C_T -Werte der endogenen Kontrolle in den Proben des Filters sind allgemein höher als von der Kontrolle in den Impingerproben, welche im Bereich der Calibratorprobe liegen. Somit scheint eher die PCR der Filterproben inhibiert zu sein. Doch genau diese Abweichungen der endogenen Kontrollen in den verschiedenen Proben werden bei der Normalisierung der Proben berücksichtigt und gehen bei der Quantifizierung in die Berechnung ein (folglich 3.5.3.3). Diese unterschiedliche Inhibition der Reaktionen beeinträchtigt demnach die Quantifizierung des Virusgenoms aus den Luftproben nicht wesentlich und stellt somit einen bemerkenswerten Vorteil gegenüber einer Quantifizierung ohne Normalisierung der Proben dar. ALVAREZ et al. (1995) und MAHER et al. (2001) berichten auch von der PCR-Inhibition in Proben von Bioaerosolen. Demnach seien hohe Konzentrationen durch fremde DNA häufig Ursache dafür. Ein weiterer, wichtiger Aspekt ist der Unterschied zwischen den Endvolumina der Proben beider Geräte. Dieses beträgt für die Impingerproben 30 ml und für die Gelatinefilter 4 ml. Höchstwahrscheinlich ist das Volumen der Impingerflüssigkeit zu

groß um die Nukleinsäuren genauso effizient wie aus den Filterproben zu isolieren (PECCIA u. HERNANDEZ 2006), worin die Ursache der niedrigeren Effizienz des Impingers begründet liegen könnte. Eine Aufkonzentrierung der Impingerflüssigkeit durch Ultrazentrifugation auf das gleiche Volumen der Filterproben wurde versucht, war aber, wie bei MAYR (2002), nicht erfolgreich. Gegen eine Angleichung der Volumina durch Verdünnung der Filterprobenflüssigkeit sprach die wahrscheinlich dadurch hervorgerufene Effizienzreduzierung des Gelatinefilters.

In den Versuchen mit IBDV stimmen die Detektionsraten für infektiöses Virus (Titration in Zellkultur) der Impingerproben mit denen für Virusgenom der Filterproben sehr gut überein (kein signifikanter Unterschied). Hier wäre demnach eine Abschätzung der Menge an infektiösen Viren in einer Luftprobe anhand der Analyse einer Filterprobe mittels quantitativer Real-Time-PCR gut möglich. Dies wäre für Einsätze in der Praxis durch die praktikable Probenentnahme mittels Filtration und der schnellen Analyse von großem Vorteil. In den Versuchen mit NDV wurde dieser Zusammenhang allerdings nicht gefunden, was auf die oben erläuterte Inaktivierung der labileren Viruspartikel im luftgetragenen Zustand bzw. infolge des Sammelstresses zurückzuführen ist. In der Praxis müssten diese Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Dennoch ist auch hier eine grobe Abschätzung der Viruslast in der Luft möglich, da, abhängig in welcher Größenordnung Virusgenom in Luftproben gefunden wird, davon auszugehen ist, dass ein Teil davon auch infektiöses Virus war.

Die ermittelten Effizienzen des Filters von 22,3 % für NDV bzw. 36,1 % für IBDV liegen unter den theoretisch möglichen 100 %. Dies ist z.T. auf physikalische Verluste und weniger auf die Zerstörung der RNA im Aerosol zurückzuführen (IJAZ et al. 1987, HERMANN et al. 2007). Zudem kann die Probenbearbeitung und eventuelle -lagerung zum Verlust an RNA führen.

Schlussfolgernd ist der Gelatinefilter sehr gut zum Nachweis von Virusgenom aus Luftproben mittels quantitativer Real-Time-PCR geeignet. Mit dieser Methode wurden für beide Viren die höchsten Detektionsraten ermittelt. PECCIA u. HERNANDEZ (2006) beschreiben, dass in vergangenen Untersuchungen von Bioaerosolen mittels PCR in über 50 % der Fälle die Filtration zur Luftkeimsammlung angewandt wurde. Jedoch wurden vor allem Oberflächenfilter aus Polycarbonaten benutzt. Die Gelatinefilter haben den Vorteil, dass sie komplett in Lösung gebracht werden könnten und sich somit alle gesammelten Mikroorganismen auch letztendlich in der Probenflüssigkeit befinden.

Auch in der Vergangenheit wurde schon der quantitative Nachweis von Mikroorganismen in Luftproben mittels PCR durchgeführt (CHO et al. 2006, QUAN et al. 2004, HIETALA et al. 2005). Dennoch existieren in der Literatur keine Angaben über die Effizienz von Sammelgeräten mit dieser Analysemethode. Die dazu durchgeführten systematischen Untersuchungen in dieser Arbeit liefern somit die ersten Ergebnisse zu dieser speziellen Thematik.

5.1.2.3 Ermittlung der tatsächlichen Viruskonzentration

Der ermittelte Virusgehalt einer Luftprobe entspricht nicht der tatsächlich vorhandenen Viruskonzentration. Diese wird meist unterschätzt, da wie oben erläutert nicht 100 % der Viren aus einer Luftprobe quantifiziert werden können. In der vorliegenden Arbeit ist z.B. die Einführung eines Korrekturfaktors eine Möglichkeit auf den wahren Virusgehalt in der Luftprobe zu schließen. Dieser Faktor kann hier anhand der Untersuchungen mit experimentell erzeugten Aerosolen abgeschätzt werden. Für beide Testviren wurde die beste Effizienz zur Virusquantifizierung durch Filtration und nachfolgender Analyse mittels Real-Time-PCR erzielt, 22,3 % für NDV bzw. 36,1 % für IBDV. Daraus ergibt sich ein Korrekturfaktor von 3 bis 4. Das heißt, mit dieser Methode wird jedes 3. bis 4. Virus in der Luftprobe detektiert wird. Bei der Detektion von infektiösen IBDV wurde eine ähnlich hohe Nachweisrate (31,8 %) mittels Impinger und Analyse in Zellkultur ermittelt. Auch hier würde ein Korrekturfaktor von 3 ausgewählt werden. Infektiöses NDV hingegen wurde mit einer Rate 4 % mit dem Impinger wiedergefunden. Hier ist die Berechnung schwieriger, da dieses behüllte Virus sehr labil und somit anfälliger für Sammelstress ist. Dies wurde schon in den Vorversuchen (4.2.2.1) gezeigt. Demnach müsste hier der Korrekturfaktor zur Berechnung des Gehaltes an infektiösen Viren ca. 25 betragen. Bei diesen rechnerischen Ansätzen wurden jedoch die physikalischen Verluste in der Aerosolkammer vernachlässigt. Weiterführende Untersuchungen wären zur zusätzlichen Einbeziehung dieser Größe und damit exakterer Berechnung eines Korrekturfaktors nötig.

Es zeigt sich, dass sich bei der Methode mit der insgesamt höchsten Effizienz, Filtration in Kombination mit der quantitativen Real-Time-PCR, auch einen ähnlicher Korrekturfaktor für beide Testviren ergibt. Dies spiegelt die gute Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens wider.

5.1.2.4 Nachweisgrenzen der Sammelgeräte

Die Grenze des Virusnachweises mit den verschiedenen Sammelgeräten und Analysemethoden wurden anhand experimentell generierter Aerosole ermittelt (Kapitel 4.2.6). Die Werte geben eine grobe Orientierung, da die zu vernebelnde Virussuspension immer 1:10 weiterverdünnt wurde. Feinere Verdünnungsstufen hätten den Bereich der Nachweisgrenzen weiter eingrenzen können. Der ermittelte niedrigste Titer des generierten Virusaerosols, welcher noch zu einem sicheren Nachweis von infektiösen Viren führte, lag bei $10^{5,53}$ EID₅₀ / m³ für NDV bzw. $10^{5,1}$ TCID₅₀ / m³ für IBDV. Diese Nachweisgrenzen wurden mit dem Impinger erzielt. Der Nachweis von Virusgenom gelang mit dem Gelatinefilter besser und führten ebenfalls bei einem Titer des Virusaerosols von $10^{5,53}$ EID₅₀ / m³ für NDV bzw. $10^{5,1}$ TCID₅₀ / m³ für IBDV zu sicher positiven Ergebnissen.

Diese Nachweisgrenzen sind allerdings auf das Sammelvolumen von 200 l zu beziehen. JASCHOF (1992a) gibt eine rein rechnerisch bestimmte Nachweisgrenze des Gelatinefilters

(50 mm Durchmesser) bei Virustiterbestimmung im embryonierten Hühnerei von $4 \times 10^4 \text{ EID}_{50} / \text{m}^3$ bei einem Luftvolumen von 22,5 l an. Zur Senkung der unteren Nachweisgrenze führt er die Erhöhung des Probenvolumens und eine Reduzierung des Lösungsmediums an (JASCHOF 1992b). Das Volumen kann prinzipiell über eine Erhöhung der Sammelgeschwindigkeit und über eine Verlängerung der Sammelzeit erzielt werden. Bei der Filtration ist die Erhöhung der Sammelgeschwindigkeit, je nach benutztem Gerät, gut möglich. Laut JASCHOF (1992a) wird weder durch Zeit noch durch die Geschwindigkeit die Überlebensfähigkeit der Viruspartikel beeinflusst. Nach den Ergebnissen in dieser Arbeit wurden die Viren hingegen schon nach der Sammelzeit von 20 min stark infolge des Sammelstresses beschädigt. Dies würde jedoch die sehr effiziente Analyse der Filterproben durch die Real-Time-PCR nicht beeinflussen. So wäre eine Sammelzeit- sowie Sammelgeschwindigkeitserhöhung zur Senkung der unteren Nachweisgrenze zu empfehlen. Bei Verwendung eines Impingers ist die Geschwindigkeit der Luftprobennahme begrenzt und eine Regulierung nur über die Zeit möglich. Hierbei kommt es jedoch durch sehr lange Laufzeiten zu einer vermehrten Schädigung schon gesammelter Viren bzw. zum „reentrainment“ der Partikel und somit zu einem erhöhten Verlust der Ausbeute (HERMANN et al. 2006). Bei Untersuchungen unter Praxisbedingungen werden häufig sehr große Probenvolumina genommen, z.B. ca. 33.000 l (HUGH-JONES et al. 1973) oder ca. 127.000 l (HIETALA et al. 2005). Dafür gibt es spezielle „High-volume-sampler“, nach dem Prinzip des Impingement funktionierend, wobei die meisten mehr als 500 l / min sammeln (PECCIA u. HERNANDEZ 2006).

5.1.3 Kritische Betrachtung der Versuchsanlage

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Apparatur wurde ein dynamisches Virusaerosol erzeugt, welches sich in einem ständigen Fluss durch die Aerosolkammer befand. Dabei wurde über die gesamte Zeit die Virussuspension „frisch“ vernebelt und war in einer konstanten Konzentration pro Volumeneinheit vorhanden. Somit wurde ein Verlust der Infektiosität der Viren durch das „Altern“ des Aerosols weitestgehend eingeschränkt und beeinflusste damit nicht die Ermittlung der Geräteeffizienzen. In anderen Untersuchungen wurde häufig erst die gesamte Virussuspension in eine Kammer vernebelt und erst dann erfolgte die Probenentnahme. Meist wurde dabei das Aerosol durch Luftumwälzung an der Sedimentation gehindert. Diese Apparaturen eignen sich besonders zur Bestimmung von Halbwertszeiten von Mikroorganismen im luftgetragenen Zustand (WEESENDORP et al. 2008) und zum Studieren des länger einwirkenden Einflusses verschiedener Luftfeuchtigkeiten (IJAZ et al. 1994, HERMANN et al. 2007).

Weiterhin ist die Sedimentation von Teilchen in Aerosolexperimenten von großer Bedeutung. Dadurch werden die Partikel dem Sammelgerät gar nicht erst zugänglich und würden die Gerä-

teffizienz fälschlicherweise reduzieren. Die Partikelgröße sollte zur Herstellung eines stabilen Aerosols kleiner als 5 μm sein (SATTAR u. IJAZ 2007). Die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung mit Hilfe des Andersen-Kaskaden-Impaktors zeigen, dass der größte Teil im Bereich von 1 - 2 μm lag und ca. 77 % aller Teilchen kleiner 6 μm waren. Das erzeugte Aerosol kann somit als stabil eingeschätzt werden. Trotzdem ist davon auszugehen, dass dem Aerosol ein Teil der Viruspartikel durch physikalische Verluste verloren gegangen ist und nicht von den Sammelgeräten, d.h. auch nicht durch den Andersen-Kaskaden-Impaktor, erfasst werden konnte (LUTZ et al. 1984). Dies beeinflusst natürlich die Bestimmung der wahren Sammeleffizienz der Geräte, ist aber ein hier nicht vermeidbarer systematischer Fehler, welcher bei der Probenentnahme auf beide Geräte gleichermaßen einwirkte. Dadurch, dass in dieser Arbeit das Aerosol kontinuierlich erzeugt wurde, wurden diese physikalischen Verluste jedoch minimiert. Denn in anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Marker von gekennzeichneten Viren direkt nach der Vernebelung zu ca. 100 % detektiert werden konnte und erst anschließend ein Abfall zu verzeichnen war (IJAZ et al. 1987, HERMANN et al. 2007). Anders verhält es sich mit den biologischen Verlusten in einem Aerosol. Dabei wurden zum Teil hohe initiale Verluste ermittelt. Zum Beispiel konnte LANDMAN u. VAN ECK (2001) direkt nach der Virusvernebelung nur noch 1 % NDV wieder finden. Dies kann jedoch neben der Virusinaktivierung durchaus im eventuell unzulänglichen Nachweissystem begründet sein.

Alle Aerosolexperimente wurden bei etwa gleicher Temperatur (17 - 21 °C) durchgeführt. Die Wirkung von unterschiedlichen Temperaturen auf luftgetragene Viren ist in Kapitel 2.2.2 beschrieben und konnte in dieser Arbeit durch die fehlende Möglichkeit zur Temperierung der Luft nicht weiter untersucht werden.

5.2 Untersuchungen an natürlich erzeugten Virus-aerosolen

5.2.1 Newcastle-Disease-Virus

5.2.1.1 Lufthygienische Untersuchungen nach Vakzinierung unter experimentellen Bedingungen

Die aerogene Ausscheidung des eingesetzten Impfvirus, Newcastle-Disease-Virus (Stamm LaSota), wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen *p.vacc.* untersucht. Zum einen sollte die Eignung des Impfers und Gelatinefilters unter Praxisbedingungen untersucht werden, zum anderen, ob generell Impfvirus in die Luft gelangt. Neben den Luftproben wurden zusätzlich regelmäßig Kloaken- und Rachentupfer sowie Blutproben (vor und nach der Impfung) entnommen.

Insgesamt waren zwei Stallluft- sowie eine Abluftprobe viruspositiv. Der Virusnachweis mittels quantitativer Real-Time-PCR war hier aber nur aus Proben des Filters erfolgreich. Die Tiere scheinen somit das Lebendimpfvirus im Organismus vermehrt und mit der Ausatemluft ausgeschieden zu haben. Unterstrichen wird dieses Ergebnis durch die Resultate der Rachentupferproben, welche in den ersten 5 Tagen *p.vacc.* alle positiv waren. Dabei handelte es sich allerdings um Poolproben, wobei folglich nicht jeder Tupfer eines Einzeltieres viruspositiv gewesen sein muss.

Da nicht mit ähnlich hohen Virustitern wie im Aerosol der Kammer gerechnet werden konnte, wurde das Probennahmenvolumen der Geräte gegenüber dem in der Kammer verfünffacht (1000 l für die Stallluft) bzw. verzehnfacht (2000 l für die Abluft). Der Virustiter der positiven Stallluftproben betrug $10^{3,5}$ EID₅₀/m³ am Tag 4 und $10^{4,3}$ EID₅₀/m³ am Tag 5. Der Titer der einzigen viruspositiven Abluftprobe am Tag 5 lag bei $10^{1,5}$ EID₅₀/m³. Diese nachgewiesenen Viruskonzentrationen lagen unter der mit künstlichem Virusaerosol ermittelten sicheren Nachweisgrenze von $10^{5,53}$ EID₅₀/m³. Dies wurde durch die Erhöhung des Probenvolumens möglich. Außerdem wurden Filter mit größerem Durchmesser (80 mm) verwendet, mit welchen durch die vergrößerte Fläche die Effektivität des Virusnachweises zusätzlich verbessert wird (JASCHOF 1992a). Da in der Literatur kein ähnliches Vakzinierungsexperiment beschrieben ist, ist eine direkte Einordnung der Ergebnisse schwierig. Die Übertragung von Newcastle-Disease-Virus über die Luft ist schon lange belegt (DELAY et al. 1948). Auch für die lentogenen Impfstämme wurde nach Versuchen von SPALATIN et al. (1976) die Übertragung ohne direkten Kontakt der Tiere nachgewiesen. HUGH-JONES et al. (1973) führten Infektionsversuche mit zwei Stämmen des NDV durch, welche virulenter als der Stamm LaSota waren. Dabei konnten sie infektiöses Virus beider Stämme in der Stallluft der erkrankten Tiere nachweisen. Der genaue Virustiter des einen Stammes (Infektion von 5 Tieren) konnte wegen der zu geringen Konzentration

on jedoch nicht bestimmt werden, der des anderen (Infektion von 20 Tieren) lag bei max. $10^{3,1}$ EID₅₀ / m³. Untersuchungen von LI et al. (2008) beweisen die Hypothese, dass eine ND-Übertragung rein über die Luft stattfinden kann. Sie setzten gesunde Hühner durch Verbindung zweier Kammern über ein Rohrsystem der Abluft von erkrankten Tieren aus. Diese entwickelten daraufhin ebenfalls eine Erkrankung. Zusätzlich sammelten sie Proben der Kammerluft der experimentell infizierten Tiere mit Hilfe des AGI-30. Sie konnten vom 2. bis zum 40. Tag nach Infektion von 25 Tieren infektiöses Virus in den Luftproben mit einer maximalen Konzentration von ca. 10^4 PFU / m³ nachweisen. Dieses Maximum entspricht in etwa der in dieser Arbeit ermittelten Viruskonzentration von Tag 5, wobei hier lediglich der Nachweis des Genoms stattfand und die Versuchsgruppe doppelt so groß war. LI et al. (2008) führten dabei keine Quantifizierung mittels PCR durch, wobei dafür ein höherer maximaler Virustiter zu erwarten wäre.

Um eine Viruskonzentrierung in der Luft zu erreichen, wurde bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch die Lüftung im Stall während der Probenentnahme ausgestellt (HUGH-JONES et al. 1973) und die Luft mit Hilfe eines Ventilators bewegt. Zudem erfolgten die Messungen morgens, wenn die Tiere eine erhöhte Aktivität zeigten und so eventuell sedimentierte Viruspartikel in die Luft übergehen (LUTZ et al. 1984). Trotzdem waren die ermittelten Daten stark abweichend mit denen von LI et al. (2008). Dies deutet darauf hin, dass infolge der Impfung zwar schon Virus in die Luft gelangt, dennoch in viel geringerem Ausmaß als bei an Feldviren erkrankten Tieren. Diese zeigen klinisch unter anderem oft starke respiratorische Symptome mit hoher Virusausscheidung über Augen-, Nasen- und Rachensekrete, aber auch gastrointestinale Störungen mit Virusausscheidung über den Kot (LUTZ et al. 1984, ALEXANDER 2008b). Dadurch gelangen wahrscheinlich mehr Viruspartikel in die Luft bzw. befinden sich in der Umgebung und können vermehrt durch „reentrainment“ in den luftgetragenen Zustand übergehen (LUTZ et al. 1984). Die Ergebnisse der Tupferproben unterstreichen ebenfalls die Auswirkung der unterschiedlichen Virulenz der Erreger. Im Versuch dieser Arbeit konnte bis zum 8. Tag nach der Impfung Virus in den Rachentupferproben nachgewiesen werden, LI et al. (2008) fanden hingegen bis zum Tag 40 noch Feldvirus in den Tupferproben.

Serologische Untersuchungen

Da zwei verschiedene ELISA-Testkits zur Untersuchung der Serumproben verwendet wurden, soll auf die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse gesondert eingegangen werden. Der Hämagglutinationshemmtest gilt im Allgemeinen als Goldstandard zur Untersuchung auf Antikörper gegen NDV. Für diesen Test reichten zum einen die gewonnenen Serummengen nach der ersten Blutentnahme nicht aus, zum anderen zeigten de WIT et al. (2007) eine sehr gute Über-

einstimmung der Ergebnisse des Hämagglutinationshemmtests mit verschiedenen kommerziell erhältlichen ELISA-Kits nach Vakzinierung mit NDV *Stamm LaSota*.

Die serologische Untersuchungen erfolgten zur Festlegung des Versuchsbeginns und zur Kontrolle des Impferfolgs. Die Ergebnisse von ELISA-Kit 1 stellten Grundlage zur Entscheidung des Versuchsstarts dar. Da über 90 % der Tiere am Lebenstag 8 keine Antikörper gegen NDV aufwiesen, wurde die Impfung am folgenden Tag durchgeführt und mit den Luftkeimmessungen begonnen. 21 Tage nach der Immunisierung hatten laut ELISA 1 nur 52 % der Tiere NDV-spezifische Antikörper gebildet. Dies ist nur ein mäßiger Impferfolg, da theoretisch 100 % der Tiere eine positive Antikörperantwort zeigen sollten (de WIT et al. 2007), die letztendlich Grundlage einer protektiven Immunität ist.

Nach Beendigung des Versuchs wurden alle Seren erneut mit einem anderen ELISA-Kit 2 untersucht. Dies erfolgte auf Grund von Untersuchungsergebnissen von SCHÖTTKER-WEGNER et al. (2008), welche erst nach Beendigung des Versuchs in einem Vortrag präsentiert wurden. Sie testeten die in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Kits und zusätzlich den Hämagglutinationshemmtest (HAH-Test) mit denselben Putenseren. Dabei war ELISA 2 (entspricht auch in dieser Arbeit ELISA 2) sensitiver als ELISA 1 und HAH-Test. Auch in der vorliegenden Arbeit gab es Abweichungen der Ergebnisse der beiden Kits. So hatten 84 % der Hühner am Lebenstag 8 positive Antikörpertiter gegen NDV bei Untersuchung mit ELISA-Kit 2. Drei Wochen nach der Impfung stimmte der Anteil von antikörperpositiven Tieren mit 50 % in etwa mit den Ergebnissen des ELISA-Kits 1 überein. Die beiden Ergebnisse des ELISA-Kits 2 bedeuten, dass der Großteil der Tiere zum Zeitpunkt der Impfung noch schützende maternale Antikörper gehabt haben könnte und somit die Impfung bei vielen Tieren dann keine vollständige Wirkung zeigen konnte. Dies hätte natürlich auch die Vermehrung und Ausscheidung des Impfvirus reduziert.

Wäre der ELISA-Kit 2 zur Festlegung des Versuchsstarts genutzt worden, wäre die Impfung später durchgeführt worden. Dies könnte daher auch einer der Gründe dafür sein, dass in nur wenigen Luftproben Virus nachgewiesen werden konnte.

5.2.1.2 Aerogene Ausscheidung nach der Vakzinierung in konventionellen Geflügelhaltungen

Neben der Untersuchung der aerogenen Virusausscheidung nach Vakzinierung unter experimentellen Bedingungen sollte dies zusätzlich unter Praxisbedingungen studiert werden. In den konventionellen Geflügelhaltungen werden mehrere Tausend Tiere in einem Stall gehalten, wodurch prinzipiell sehr viel Virus in die Luft abgegeben werden könnte. Auch durch die Bewegung dieser großen Tierzahl wird zum Teil enorm viel Staub aufgewirbelt, an welchen sich Virus befinden könnte (LUTZ et al. 1984). Dennoch wurde zu keinem Zeitpunkt Impfvirus in

einer Luftprobe oder in den stichprobenartig entnommenen Rachtupferpoolproben mittels Real-Time-PCR gefunden. Wahrscheinlich haben die Tiere kein oder nur sehr wenig Virus ausgeschieden und diese Viruskonzentration lag dann deutlich unter der Nachweisgrenze des Filters (GRINSHPUN et al. 2007). Hinzu kommt, dass die Lüftung der Ställe ständig in Betrieb war und somit eventuell vorhandene Viren weiter verdünnt wurden. Die Tatsache der extremen Verdünnung von infektiösen Aerosolen ist ein generelles Problem für deren Detektion (ROY u. MILTON 2004). In beiden untersuchten Betrieben wurde parallel auch eine serologische Diagnostik durchgeführt. In Betrieb 1 war kein signifikanter Anstieg an seropositiven Tieren nach der 1. Impfung zu verzeichnen, in Betrieb 2 dagegen schon, wobei jedoch immer noch 37 % der Tiere keinen ausreichenden Antikörpertiter zeigten. Die erste Immunisierung in den Beständen der konventionellen Hühnerhaltung war daher nicht bei allen Tieren erfolgreich und das Impfvirus wurde nicht von allen Tieren vermehrt. Es ist aber anzumerken, dass die Stichprobenanzahl von 20 bzw. 30 Tieren im Verhältnis zu den hohen Tierzahlen dabei sehr klein ist.

HUGH-JONES et al. (1973) und HIETALA et al. (2005) untersuchten auch Luftproben in Ställen konventioneller Geflügelhaltungen, allerdings während eines Ausbruches der Newcastle Disease. Erstere fanden infektionsfähige Viren mit einem Titer von $10^{5,7}$ EID₅₀ in 33 m³, letztere wiesen mittels PCR maximal 10^3 EID₅₀ in ca. 127 m³ nach. Es wird deutlich, dass auch bei erkrankten Hühnerbeständen, wo eine hohe aerogene Viruskonzentration zu erwarten ist, sehr große Probenvolumina notwendig sind, um sicher Virus in der Luft nachweisen zu können.

5.2.2 Infektiöse-Bursitis-Virus

Annähernd analog dem NDV wurden lufthygienische Untersuchungen nach der Vakzinierung gegen die Infektiöse Bursitis sowohl unter experimentellen Bedingungen als auch in konventionellen Haltungssystemen durchgeführt. Die Infektiöse Bursitis ist eine hochkontagiöse Erkrankung. Nach Infektion scheiden die Tiere massiv Virus über den Kot aus. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral, aber auch eine aerogene Übertragung in stark betroffenen Gebieten ist wahrscheinlich (VAN DEN BERG 2008a). Das unbehüllte Virus hat eine hohe Tenazität und bleibt in der Umwelt über Monate hinweg stabil. Deshalb wurde zusätzlich zu dem labileren NDV das IBDV als Modellvirus für die Untersuchungen ausgewählt. Jedoch konnte weder nach Vakzinierung unter experimentellen Bedingungen, noch in konventionellen Geflügelhaltungen das Impfvirus in der Luft wiedergefunden werden. Wie die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der vakzinierten Tiere des Experimentierstalls in 4.3.2 zeigen, besaßen fast alle Tiere weder vor noch 21 Tage nach der Impfung Antikörper gegen IBDV. Zudem war auch nur jeweils eine Tupferpoolprobe von Rachen bzw. Kloake viruspositiv. Dies deutet auf eine nicht erfolgreiche Immunisierung hin. Gründe dafür können hohe Titer von maternalen Antikörpern

zum Vakzinierungszeitpunkt, falsche Impfstoffapplikation oder -lagerung sowie der Impfstoff an sich sein. In dieser Arbeit ist von einer korrekten Impfstoffapplikation sowie -lagerung auszugehen. Diese erfolgten nach Herstellervorschrift, wobei zur Förderung der Virusvermehrung die 3-fache Impfdosis verabreicht wurde. Die Seren aller Tiere wurden vor Vakzinierung am 8. Lebenstag auf Antikörper untersucht und waren negativ. Im Allgemeinen ist länger mit positiven maternalen Antikörpertitern zu rechnen, jedoch kann die Titerhöhe zwischen den Tieren sehr inhomogen verteilt sein, so dass es auch Tiergruppen mit generell sehr niedrigen maternalen Antikörpertitern gibt (VAN DEN BERG u. MEULEMANS 1991, KRAEMER 2004). Gerade bei Küken des Masttyps erfolgt ein schnellerer Abbau der maternalen Antikörper als bei denen des Legetyps (KALETA et al. 1977). Möglich ist auch hier eine unzureichende Sensitivität des verwendeten ELISA-Kits, so dass eventuell doch noch maternale Antikörper vorhanden gewesen sein könnten. Jedoch wurden keine vergleichenden Untersuchungen vorgenommen und eine Beurteilung des Tests ist deshalb nicht möglich. Über ein mögliches Versagen des Impfstoffes kann auch nur spekuliert werden, jedoch kommt dieser weltweit erfolgreich zum Einsatz.

Zusammenfassend sind durch die unerwartet aufgetretenen Probleme bei der Vakzinierung der Hühner im Tierexperiment keine Rückschlüsse auf eine Impfvirusausscheidung in die Luft zu ziehen. Durch die hohe Stabilität des Virus in der Umwelt und dessen Ausscheidung mit dem Kot (VAN DEN BERG 2008a), lag die Vermutung nahe, dass Viren durch „reentrainment“ in die Luft gelangen und so in den Luftproben nachweisbar werden. Die negativen Ergebnisse der stichprobenartigen Untersuchungen in den konventionellen Haltungen lassen jedoch darauf schließen, dass die Viren in der Stallluft eventuell in so geringer Konzentration vorkamen, welche unter der Nachweisgrenze des Gerätes lag (GRINSHPUN et al. 2007).

5.3 Resümee

In dieser Arbeit konnten die Effizienzen zweier Luftkeimsammelgeräte (Impinger AGI-30 und Gelatinefilter) zum Virusnachweis aus Luftproben mit verschiedenen Nachweismethoden bestimmt werden. Der Gelatinefilter in Kombination mit der quantitativen Real-Time-PCR erwies sich bei beiden untersuchten Testviren als die effizienteste und sensitivste Methode. Dabei wurde erstmals die quantitative Real-Time-PCR mit Normalisierung der Proben zur quantitativen Bestimmung des Virusgenoms aus Luftproben angewandt. Diese Vorgehensweise hatte den großen Vorteil, dass unterschiedlich starke Effizienzen der Nukleinsäureaufreinigung und -umschreibung sowie PCR-Inhibitionen der verschiedenen zusammengesetzten Proben gut ausgeglichen werden konnten. Damit sind die Proben untereinander besser vergleichbar und die Quantifizierung genauer. Außerdem stellt sie eine sehr schnelle und präzise Methode dar und kann auch für Viren ohne etabliertes Zellkultursystem angewandt werden (PECCIA u.

HERNANDEZ 2006). Erstmals wurden auch Geräteeffizienzen unter Anwendung verschiedener Virusnachweismethoden verglichen.

Die Technik der Filtration in Kombination mit der quantitativen Real-Time-PCR stellt zudem eine Methode dar, welche ideal in der Praxis einsetzbar ist. Durch kommerziell erhältliche, mobile Luftkeimsammler, welche auf dem Prinzip der Filtration beruhen, ist deren Verwendung auch in Tierstallungen gut möglich. In dieser Arbeit wurde dazu der AirPort® MD8 verwendet, welcher sich durch seine sehr einfache Handhabung sowie durch seinen geräucharmen Betrieb auszeichnete. Ein Nachteil des Gerätes ist die begrenzte Luftsammelrate von 50 l/min. Dadurch würde die Entnahme von größeren Luftmengen in der Größenordnung von 100 m³ (HIETALA et al. 2005) zu unrealistisch langen Laufzeiten von mehr als 30 Stunden führen. Für die Untersuchungen zu den luftgetragenen Impfviren nach Vakzinierung der Tiere in konventionellen Haltungssystemen wären aber wahrscheinlich größere Luftprobenvolumina nötig gewesen um Virus nachweisen zu können. Für zukünftige Untersuchungen ist daher ein Sammelgerät vorzuschlagen, mit welchem schnell große Probenvolumina entnommen werden können und das Endvolumen der Probenflüssigkeit dennoch gering ist, um die luftgetragenen Viren optimal zu konzentrieren. Dazu müssen weiterführend andere Sammelgeräte wie z.B. die modernen High-volume-sampler mit den in dieser Arbeit etablierten Nachweismethoden studiert werden. Wäre mit diesen Geräten ein quantitativer Nachweis der Impfviren in der Stallluft möglich, könnte man auf einfache, schnelle und präzise Weise z.B. die Verteilung dieser Modellviren in Ställen verschiedener Haltungssysteme bzw. den Austritt dieser in die Umgebungsluft untersuchen. Dies würde zu wichtigen Ergebnissen in Hinblick auf die Bekämpfung aerogen übertragbarer, viraler Tierseuchenerreger führen.

6 Zusammenfassung

Anika Friese

Ausbreitung von Viren über die Luft: Eine Studie verschiedener Sammelgeräte und Quantifizierungsmethoden zur Virusisolierung aus der Luft

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2009

88 Seiten, 22 Abbildungen, 19 Tabellen, 161 Literaturangaben, Anhang

Schlüsselwörter: Bioaerosol, Impinger, Gelatinefilter, Luftkeimsammlung, quantitativer Virusnachweis, NDV, IBDV

Die aerogene Übertragung von Infektionskrankheiten stellt ein sehr wichtiges Thema in der Medizin dar. Für genaue Untersuchungen dazu, sind geeignete Sammel- und Nachweismethoden essentiell. Die Untersuchung verschiedener Sammelgeräte sowie unterschiedlicher Nachweismethoden zur Virusquantifizierung aus der Luft war daher die zentrale Aufgabenstellung in dieser Arbeit. Als Sammelgeräte wurden der Impinger AGI-30 und der Gelatinefilter ausgewählt. Alle grundlegenden Untersuchungen zur Ermittlung der Eignung und Effizienzen der Geräte bezüglich der Virusisolierung aus Luftproben wurden an experimentell erzeugten Virus-aerosolen durchgeführt. Dabei wurden zwei Geflügelviren verwendet, das Newcastle-Disease-Virus *Stamm LaSota* (NDV) und das Infektiöse-Bursitis-Virus *Stamm Cu-1M* (IBDV). Die quantitative Bestimmung der Viren aus den Luftproben erfolgte durch Titration im Zellkultursystem bzw. in embryonierten Hühnereiern. Parallel dazu wurde eine Titerbestimmung mittels einer in dieser Arbeit etablierten quantitativen Real-Time-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden die Sammelgeräte unter praktischen Bedingungen getestet und verglichen. Dazu erfolgten lufthygienische Messungen nach Vakzinierung von Geflügel mit Lebendimpfstoffen (NDV *LaSota* und IBDV *Cu-1M*). Es wurden umfangreiche Untersuchungen unter experimentellen Bedingungen und später exemplarische Untersuchungen in konventionellen Geflügelhaltungen durchgeführt.

Die Evaluierung der Sammelgeräte mit Hilfe der experimentell erzeugten Virus-aerosole ergab, dass mit beiden Geräten sowohl infektiöses Virus als auch Virusgenom nachgewie-

sen und quantifiziert werden kann. Die Effizienzen unterschieden sich jedoch z.T. deutlich. So stellte sich der Gelatinefilter zur Sammlung in Kombination mit dem quantitativen Virusnachweis mittels Real-Time-PCR als die Methode mit der höchsten Virusnachweisrate (angegeben als geometrischer Mittelwert mit geometrischer Standardabweichung) von 22,3 % \times / 3,1 für NDV und 36,1 % \times / 3,4 für IBDV heraus. Der Nachweis von infektiösen Viren jedoch, war für beide Testkeime aus den Proben des Impingers erfolgreicher (NDV 4,0 % \times / 1,7 und IBDV 31,8 % \times / 1,8). Die signifikant niedrigere Nachweisrate des Newcastle-Disease-Virus ist auf die höhere Empfindlichkeit dieses behüllten Virus beim Sammelprozess und daraus folgender Inaktivierung zurückzuführen. Die Quantifizierung mit Hilfe der Real-Time-PCR erfolgte mit Normalisierung aller Proben. Diese bisher zur Analyse von Luftproben noch nicht angewandte Methode erwies sich als sehr gut. Durch die Normalisierung werden nicht nur die abweichenden Effizienzen der Nukleinsäureisolierung sowie der reversen Transkription ausgeglichen, sondern auch die unterschiedliche Inhibition der PCR der Proben verschiedener Luftkeimsammler. Damit sind die Proben untereinander besser vergleichbar und die Quantifizierung exakter. Erstmals wurden auch systematische Untersuchungen zu Geräteeffizienzen in Kombination mit verschiedenen Virusnachweismethoden durchgeführt.

Bei den lufthygienischen Untersuchungen nach Vakzinierung von ca. 50 Hühnern gegen Newcastle Disease (ND) bzw. Infektiöse Bursitis (IBD) unter experimentellen Bedingungen, waren drei Luftproben nach der Impfung gegen ND viruspositiv, jedoch keine nach der gegen IBD. Diese positiven Nachweise gelangen mit dem Gelatinefilter und nachfolgender Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR. Schlussfolgernd ist zumindest bei dem NDV eine aerogene Ausscheidung des Impfvirus anzunehmen. Wahrscheinlich liegt die Viruskonzentration in der Luft jedoch meist unter der Nachweisgrenze der eingesetzten Geräte. Auch die Auswertung von Luftproben nach Vakzinierung gegen oben genannte Krankheiten in konventionellen Tierhaltungen mit mehreren Tausend Tieren Besatz pro Stall führte zu keinen viruspositiven Ergebnissen. Anscheinend wurden die Viren auch trotz der großen Tierzahl in der Luft so stark verdünnt oder in so geringem Maße ausgeschieden, dass sie mit den in dieser Arbeit entnommenen Luftprobenvolumina von 1000 l nicht detektiert werden konnten. Für weiterführende Untersuchungen müsste daher ein Sammelgerät verwandt werden, mit welchem schnell große Probenvolumina entnommen werden können und das Endvolumen der Probenflüssigkeit dennoch gering ist, um die luftgetragenen Viren optimal zu konzentrieren.

Schlussfolgernd erwies sich die Filtration in Kombination mit der normalisierten quantitativen Real-Time-PCR dennoch insgesamt als eine sehr valide und praktikable Methode zum Nachweis luftgetragener Viren aus Tierhaltungen.

7 Summary

Anika Friese

Spread of airborne viruses: A study about different collection instruments and methods of virus quantification in air samples

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2009

88 Pages, 22 Figures, 19 Tables, 161 References, Appendix

Keywords: bioaerosol, impinger, gelatine filter, quantitative virus detection, sampling microorganisms, NDV, IBDV

The transmission of infectious diseases presents a very important topic in medicine. Especially airborne viral diseases are of great danger and consistently attract public attention. The development and improvement of different methods for quantitative virus detection in air samples is, therefore, hugely important. In contrast to bacteria and fungi, only a few studies about viruses exist due to the difficulties in collecting and detecting airborne viruses.

The investigation of various collection instruments as well as different detection methods of quantifying airborne viruses is the central task in this thesis. The impinger AGI-30 and the gelatine filter were selected as collection instruments. All fundamental tests for determining and improving the efficiency of the instruments for virus isolation from air samples were performed in an aerosol chamber. Therefore two viruses, Newcastle disease virus *strain LaSota* (NDV) and Infectious bursitis disease virus *strain Cu-1M* (IBDV), were nebulized. Quantification of virus particles in air samples were made by titration in cell culture (IBDV) or in embryonated chicken eggs (NDV). In parallel, virus was quantified by real-time PCR established in this study. Furthermore the detection instruments were examined and compared in practical terms. Therefore, hygienic analyses of the air in stables after vaccination of poultry with live vaccines (NDV *LaSota* and IBDV *Cu-1M*) were made. Both, extensive investigations under experimental conditions and in commercial henhouses were done.

Summary

In result, both methods were able to detect infectious virus as well as virus genome in aerosols, however, with different efficiencies. Virus detection using gelatine filters and subsequent real-time PCR was shown to be the most efficient method for both viruses (22.3 % \times / 3.1 for NDV and 36.1 % \times / 3.4 for IBDV). The detection rate of infectious virus, however, was better using the impinger (NDV 4.0 % \times / 1.7 and IBDV 31.8 % \times / 1.8). Probably the fragile lipid envelope of NDV causes this dramatic influence of the sampling stress, resulting in a high loss of infectivity.

Virus quantification by real-time PCR was performed by mean of normalization of all samples. This method is so far not commonly used for analysing air samples but it was shown to be well adapted for this purpose. By normalization divergent efficiencies of nucleic acid isolation and reverse transcription as well as different pcr inhibitions of various air samples are compensated. This results in a higher accuracy of the quantification, leading to more reliable results. These systematic investigations of efficiencies of different instruments in combination with different virus detection methods were performed in this study for the first time.

Under experimental conditions Newcastle disease virus could be found in three air samples after vaccination of 50 hens. No virus could be detected in the air after vaccination against Infectious bursitis. These positive results were achieved by using gelatine filters in combination with quantitative real-time PCR. In commercial hen stables with several thousand animals all air samples (1000 l) taken after vaccination against ND respectively IBD were negative. It may be concluded that the small amount of virus released by the vaccinated birds is diluted far below the detection limit, for instance, by the large air volume of the stables as well as by the ventilation.

For further investigations a collection instrument which takes air samples of larger volumes in combination with a small end volume of sample fluid for optimal virus concentration should be intended.

In summary filtration in combination with normalized quantitative real-time PCR analyses was shown to be a precise and practicable method for detection of airborne viruses in animal husbandary.

8 Literaturverzeichnis

- Abu Al-Soud W, Rådström P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(10):3748–53.
- Adams DJ, Spendlove JC, Spendlove RS, Barnett BB. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 44(4):903–8.
- Aengst C. Zur Zusammensetzung des Staubes in einem Schweinstall. *Tierarztl Umschau.* 1984; 43:657–64.
- Agranovski IE. New personal sampler for viable airborne viruses feasibility study. *J of Aerosol Sci.* 2005; 36(5-6):609-617.
- Agranovski IE, Safatov AS, Borodulin AI, Pyankov OV, Petrishchenko VA, Sergeev AN et al. Inactivation of viruses in bubbling processes utilized for personal bioaerosol monitoring. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(12):6963–7.
- Alexander DJ. Orthomyxoviridae. In: Pattison M, McMullin PF, Bradbury JM, Alexander DJ, Hrsg. *Poultry diseases.* 6th ed. Edinburgh: Saunders Elsevier; 2008a: 317–32.
- Alexander DJ. Paramyxoviridae. In: Pattison M, McMullin PF, Bradbury JM, Alexander DJ, Hrsg. *Poultry diseases.* 6th ed. Edinburgh, New York: Elsevier Saunders; 2008b: 317–32.
- Alvarez AJ, Buttner MP, Stetzenbach LD. PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(10):3639–44.
- Amaral Doel CMF, Gloster J, Valarcher J. Airborne transmission of foot-and-mouth disease in pigs: Evaluation and optimisation of instrumentation and techniques. *Vet J.* 2009; 179(2):219–24.
- Andersen AA. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J Bacteriol.* 1958; 76(5):471–84.
- Bayeva LYe, Shirman GA, Ginevskaya VA, Kucharská Z, Dotlacilová L, Danes L et al. Using different sorbents for the concentration of enteroviruses. *J hyg epid microb im.* 1990; 34(2):199–205.
- Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1991; 26(3-4):301–34.
- Benbough JE. Some factors affecting the survival of airborne viruses. *J Gen Virol.* 1971; 10(3):209–20.
- Booth TF, Kournikakis B, Bastien N, Ho J, Kobasa D, Stadnyk L et al. Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *J Infect Dis.* 2005; 191(9):1472–7.
- Bourgueil E, Hutet E, Cariolet R, Vannier P. Experimental infection of pigs with the porcine respiratory coronavirus (PRCV): measure of viral excretion. *Vet Microbiol.* 1992a; 31(1):11–8.
- Bourgueil E, Hutet E, Cariolet R, Vannier P. Air sampling procedure for evaluation of viral excretion level by vaccinated pigs infected with Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Res Vet Sci.* 1992b; 52(2):182–6.
- Burge HA, Solomon WR. Sampling and analysis of biological aerosols. *Atmos Environ.* 1987; 21(2):251–6.

Burton NC, Grinshpun SA, Reponen T. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg.* 2007; 51(2):143–51.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25(2):169–93.

Buttner MP, Stetzenbach LD. Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(1):219–26.

Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1988; 85(23):8790–4.

Cho JG, Dee SA, Deen J, Trincado C, Fano E, Jiang Y et al. The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity on the shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols from experimentally infected pigs. *Can J Vet Res.* 2006; 70(4):297–301.

Cho JG, Deen J, Dee SA. Influence of isolate pathogenicity on the aerosol transmission of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res.* 2007; 71(1):23–7.

Christensen LS, Mortensen S, Bøtner A, Strandbygaard BS, Rønsholt L, Henriksen CA et al. Further evidence of long distance airborne transmission of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Vet Rec.* 1993; 132(13):317–21.

Cox CS. Airborne bacteria and viruses. *Sci prog.* 1989; 73(292 Pt 4):469–99.

Dee SA, Deen J, Jacobson L, Rossow KD, Mahlum C, Pijoan C. Laboratory model to evaluate the role of aerosols in the transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec.* 2005; 156(16):501–4.

Delay PD, Deome KB, Bankowski RA. Recovery of Pneumoencephalitis (Newcastle) Virus From the Air of Poultry Houses Containing Infected Birds. *Science* 1948; 107(2784):474–5.

Donaldson AI, Alexandersen S. Predicting the spread of foot and mouth disease by airborne virus. *Rev - Off Int Epizoot.* 2002; 21(3):569–75.

Donaldson AI, Ferris NP. The survival of some air-borne animal viruses in relation to relative humidity. *Vet Microbiol.* 1976;413–20.

Donaldson AI, Gloster J, Harvey LD, Deans DH. Use of prediction models to forecast and analyse airborne spread during the foot-and-mouth disease outbreaks in Brittany, Jersey and the Isle of Wight in 1981. *Vet Rec.* 1982; 110(3):53–7.

Donaldson AI, Herniman KA, Parker J, Sellers RF. Further investigations on the airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J Hyg-Cambridge.* 1970; 68(4):557–64.

Dorak MT. Real-time PCR. *BIOS advanced methods.* New York: Taylor & Francis; 2006.

Dubovi EJ, Akers TG. Airborne stability of tailless bacterial viruses S-13 and MS-2. *Appl microbiol.* 1970; 19(4):624–8.

EN 481: Arbeitsplatzatmosphäre-Festlegung der Teilchengrößenverteilung zur Messung luftgetragener Partikel

Ellen HH, Bottcher RW, Wachenfelt E von, Takai H. Dust levels and control methods in poultry houses. *J Agric Saf Health.* 2000; 6(4):275–82.

Fabian P, McDevitt JJ, DeHaan WH, Fung ROP, Cowling BJ, Chan KH et al. Influenza virus in human exhaled breath: an observational study. *PLoS ONE* 2008; 3(7):e2691.

Flügge C. Ueber Luftinfection. *Z Hyg Infektionskr.* 1897; 25:179–224.

- Frank GH, Marshall RG, Smith PC. Clinical and immunologic responses of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus after infection by viral aerosol or intramuscular inoculation. *Am J Vet Res.* 1977; 38(10):1497–502.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999; 26(1):112-22, 124-5.
- Friedrich Löffler Institut. Amtliche Methodensammlung für anzeigepflichtige Tierseuchen; 2009.
- Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Brüning T et al. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* 2002; 16(2):99–110.
- Gerabek WE, Haage BD, Keil G, Wegner W. *Enzyklopädie Medizingeschichte.* Berlin: de Gruyter; 2005.
- Gerthsen C. *Gerthsen Physik.* 20. Aufl. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
- Gibson CF, Donaldson AI. Exposure of sheep to natural aerosols of foot-and-mouth disease virus. *Res Vet Sci.* 1986; 41(1):45–9.
- Gillespie RR, Hill MA, Kanitz CL. Infection of pigs by aerosols of Aujeszky's disease virus and their shedding of the virus. *Res Vet Sci.* 1996; 60(3):228–33.
- Gillespie RR, Hill MA, Kanitz CL, Knox KE, Clark LK, Robinson JP. Infection of pigs by Aujeszky's disease virus via the breath of intranasally inoculated pigs. *Res Vet Sci.* 2000; 68(3):217–22.
- Gloster J, Champion HJ, Sørensen JH, Mikkelsen T, Ryall DB, Astrup P et al. Airborne transmission of foot-and-mouth disease virus from Burnside Farm, Heddon-on-the-Wall, Northumberland, during the 2001 epidemic in the United Kingdom. *Vet Rec.* 2003; 152(17):525–33.
- Gloster J, Doel C, Gubbins S, Paton DJ. Foot-and-mouth disease: measurements of aerosol emission from pigs as a function of virus strain and initial dose. *Vet J.* 2008; 177(3):374–80.
- Gloster J, Williams P, Doel C, Esteves I, Coe H, Valarcher J. Foot-and-mouth disease - quantification and size distribution of airborne particles emitted by healthy and infected pigs. *Vet J.* 2007; 174(1):42–53.
- Goldberg J, Watkins HM, Boerke EE, Chatigny MA. The use of a rotating drum for the study of aerosols over extended periods of time. *Am J of Hyg.* 1958; 68(1):85–93.
- Goldmann DA. Transmission of viral respiratory infections in the home. *Pediatr. Infect Dis J.* 2000; 19(10 Suppl):S97-102.
- Grinshpun SA, Buttner MP, Willeke K. Sampling for Airborne Microorganisms. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland J, Lipson D, Mills A, Stetzenbach L, Hrsg. *Manual of Environmental Microbiology.* 3. Aufl. Washington: American Society for Microbiology; 2007. 939–51.
- Guerin LF, Mitchell CA. A Method for Determining the Concentration of Air Borne Virus and Sizing Droplet Nuclei Containing the Agent. *Can J Comp Med Vet Sci.* 1964; 28(12):283–7.
- Haferkorn R, Schneweis KE, Brandis. Vergleichende Untersuchungen über Nachweisverfahren von Bakteriophagen aus Aerosolen sowie über das Rückhaltevermögen von Filtern und Impingern für Bakteriophagenaerosole. *Arch Hyg.* 1968; 152:97–106.
- Hamscher G, Pawelzick HT, Sczesny S, Nau H, Hartung J. Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers? *Environ Health Perspect.* 2003; 111(13):1590–4.
- Harper GJ. The influence of environment on the survival of airborne virus particles in the laboratory. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1963; 13:64–71.

- Hartung J. Odour prevention and control of organic sludge and livestock farming. In: Nielsen VC, Voorburg JH, Hrsg. Odour prevention and control of organic sludge and livestock farming. [proceedings of a seminar held in Silsoe, United Kingdom, 15 - 19 April 1985]. London: Elsevier; 1986: 321–32.
- Hartung J. Emissionen luftgetragener Stoffe aus Nutztierställen. *Pneumologie* 1992; 46(5):196–202.
- Hartung J. Art und Umfang der von Nutztierställen ausgehenden Luftverunreinigungen. *DTW. Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1998; 105(6):213–6.
- Hartung J, Seedorf J. Zum Auftreten von Endotoxinen in der Luft von Nutztierställen. *Atemweg Lungenkrank.* 1999; 25(11):645–50.
- Hartung J, Whyte RT. Erfassung und Bewertung von Luftverunreinigungen in der Nutztierhaltung. *Atemweg Lungenkrank.* 1994; (20):17–25.
- Hatch MT, Warren JC. Enhanced recovery of airborne T3 coliphage and *Pasteurella pestis* bacteriophage by means of a presampling humidification technique. *Appl Microbiol.* 1969; 17(5):685–9.
- Hermann JR, Hoff SJ, Yoon KJ, Burkhardt AC, Evans RB, Zimmerman JJ. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(7):4811–8.
- Hermann J, Hoff S, Muñoz-Zanzi C, Yoon K, Roof M, Burkhardt A et al. Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols. *Vet Res.* 2007; 38(1):81–93.
- Hietala SK, Hullinger PJ, Crossley BM, Kinde H, Ardans AA. Environmental air sampling to detect exotic Newcastle disease virus in two California commercial poultry flocks. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 17(2):198–200.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* 1992; 10(4):413–7.
- Hilliger HG. Emissionen von Staub und Keimen aus Ställen. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1991; 98(7):257–61.
- Hirst JM. Bioaerosols: Introduction, retrospect and prospect. In: Cox CS, Wathes CM, Hrsg. *Bioaerosols handbook*. Boca Raton: Lewis Publishers; 1995: 1–10.
- Hogan CJ, Kettleson EM, Lee M, Ramaswami B, Angenent LT, Biswas P. Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles. *J Appl Microbiol.* 2005; 99(6):1422–34.
- Holzappel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 2007; 37(2):120–6.
- Hopkins SR, Drury LN. Efficacy of air filters in preventing transmission of Newcastle disease. *Avian Dis.* 1971; 15(3):596–603.
- Hoy S, Gauly M, Kiefer J. *Nutztierhaltung und -hygiene: Grundwissen Bachelor*. Stuttgart: UTB; 2006.
- Hugh-Jones M, Allan WH, Dark FA, Harper GJ. The evidence for the airborne spread of Newcastle disease. *J Hyg (Lond)* 1973; 71(2):325–39.
- Hyslop NS. Factors influencing the epidemiology and epizootiology of airborne diseases. *J Am Vet Med Assoc.* 1971; 159(11):1500–7.
- Ijaz MK, Karim YG, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM. Development of methods to study the survival of airborne viruses. *J Virol Methods.* 1987; 18(2-3):87–106.

- Ijaz MK, Sattar SA, Alkarmi T, Dar FK, Bhatti AR, Elhag KM. Studies on the survival of aerosolized bovine rotavirus (UK) and a murine rotavirus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1994; 17(2):91–8.
- Ijaz MK, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS. Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture. *Appl Environ Microbiol*. 1985; 49(2):289–93.
- Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamagishi H, Iwasaki S, Mitoma Y. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal Biochem*. 1995; 229(2):207–13.
- Jackwood DH, Saif YM, Hughes JH. Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. *Avian Dis*. 1987; 31(2):370–5.
- Jarnych VS. *Aerosole: Theorie und Praxis der Aerosolanwendung in Veterinärmedizin und Tierproduktion*. Berlin: Deutscher landwirtschaftsverlag; 1976.
- Jaschof H. Sammlung von Viraerosolen mit dem Gelatine-Membranfilter. *Biotec*. 1992a; 4:22–6.
- Jaschof H. Sammlung von Viraerosolen-Vergleichende Untersuchungen zur Effektivität von Gelatine-Membranfilter, Schlitzsammler und Impinger. *Biotec* 1992b; 5:24–7.
- Kaleta EF, Siegmann O, Lai KW, Aussum D. Kinetics of NDV-specific antibodies in chickens. VI. Elimination of maternal and injected antibodies. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1977; 90(7):131–4.
- Karim YG, Ijaz MK, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM. Effect of relative humidity on the airborne survival of rhinovirus-14. *Can J Microbiol*. 1985; 31(11):1058–61.
- Kösters J. Die Geflügelhalterlunge. *Deutsche Geflügelwirtschaft und Schweineproduktion* 1984; (2):35.
- Kournikakis B, Netolitzky D, Fildes J. Effects of Temperature and Relative Humidity on the Survival of Newcastle Disease Virus Aerosols in the Rotating Drum. Memorandum 1261; 1987 1-17; Alberta, Canada. 1987.
- Kraemer C. Untersuchungen zu Restpathogenität, Wirksamkeit und immunsuppressiver Eigenschaften verschiedener Gumboro-Virus-Lebendimpfstoffe in Broilern [Dissertation vet. med.] Hannover: Tierärztl. Hochsch., 2004.
- Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62(3):1102–6.
- Kühne BS, Oschmann P. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques* 2002; 33(5):1078-84.
- Landman WJ, van Eck JH. Aerosolization of Newcastle disease vaccine virus and *Enterococcus faecalis*. *Avian Dis*. 2001; 45(3):684–7.
- Li X, Chai T, Wang Z, Song C, Cao H, Liu J et al. Occurrence and transmission of Newcastle disease virus aerosol originating from infected chickens under experimental conditions. *Vet Microbiol*. 2008; 136 (3-4):226-32
- Limpert E, Stahel W, Abbt M. Log-normal distribution across the Sciences: Keys and Clues. *Bioscience* 2001; 51:341–52.
- Lin X, Reponen T, Willeke K, Wang Z, Grinshpun SA, Trunov M. Survival of Airborne Microorganisms During Swirling Aerosol Collection. *Aerosol Sci Technol*. 2000; 32(3):184–96.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402–8.

Lomniczi B. Plaque assay for avirulent (lentogenic) strains of Newcastle disease virus. *Appl Microbiol.* 1974; 27(6):1162–3.

Lukert PD, Davis RB. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Dis.* 1974; 18(2):243–50.

Lutz B, Koch KM, Müller W, Strauch D. Behavior of Newcastle disease virus in the airborne state. 1. Experimental study of particle binding of the virus. *ZBL Vet Med B.* 1984; 31(5):321–8.

Mack H, Mekerle J, Strauch D. Vorläufige Mitteilung über die Isolierung von Aujeszky-Virus aus Fest- und Flüssigmist von Schweinen sowie aus Stallluft. *Tierarztl Umsch.* 1986; 41:32–8.

Maher N, Dillon HK, Vermund SH, Unnasch TR. Magnetic bead capture eliminates PCR inhibitors in samples collected from the airborne environment, permitting detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(1):449–52.

Mainelis G. Design and Collection Efficiency of a New Electrostatic Precipitator for Bioaerosol Collection. *Aerosol Sci Technol.* 2002; 36(11):1073-1085.

May KR, Druett HA. The pre-impinger, a selective aerosol sampler. *Br J Ind Med.* 1953; 10(3):142–51.

Mayhew CJ, Zimmerman WD, Hahon N. Assessment of aerosol stability of yellow fever virus by fluorescent-cell counting. *Appl Microbiol.* 1968; 16(2):263–6.

Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G. *Virologische Arbeitsmethoden. Band 1.* Stuttgart: Fischer-Verlag; 1974.

Mayr CF. Nachweis von luftgetragenen Viren an Standorten der Abfall- und Abwasserentsorgung [Dissertation agr.]. Hohenheim: Universität Hohenheim; 2002.

Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn.* 2001; 3(2):55–61.

Mitchell CA, Guerin LF. Influenza A of human, swine, equine and avian origin: comparison of survival in aerosol form. *Can J Comp Med.* 1972; 36(1):9–11.

Moe K, Harper GJ. The effect of relative humidity and temperature on the survival of bovine rotavirus in aerosol. *Arch Virol.* 1983; 76(3):211–6.

Mohr AJ. Fate and Transport of Microorganisms in Air. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland J, Lipson D, Mills A, Stetzenbach L, Hrsg. *Manual of Environmental Microbiology.* 3. Aufl. Washington: American Society for Microbiology; 2007. 9161–971.

Müller H, Islam MR, Raue R. Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet Microbiol.* 2003; 97(1-2):153–65.

Müller W, Wieser P. Origin, quantity and quality of microbial emissions in animal houses. Dust and microbial emissions from animal production. In: Strauch D. Hrsg. *Animal production and environmental health.* Amsterdam: Elsevier; 1987. 47–89.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol.* 1987; 155:335–50.

Pearson CC, Sharples TJ. Airborne dust concentrations in livestock buildings and the effect of feed. *J Agr Eng Res.* 1995; 60(3):145–54.

- Peccia J, Hernandez M. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science A review. *Atmos Environ*. 2006; 40(21):3941–61.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):e45.
- Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 2004; 10(1):92–5.
- Pyankov OV, Agranovski IE, Pyankova O, Mokhonova E, Mokhonov V, Safatov AS et al. Using a bioaerosol personal sampler in combination with real-time PCR analysis for rapid detection of airborne viruses. *Environ Microbiol*. 2007; 9(4):992–1000.
- Quan M, Murphy CM, Zhang Z, Alexandersen S. Determinants of early foot-and-mouth disease virus dynamics in pigs. *J Comp Pathol*. 2004; 131(4):294–307.
- Ratanasethakul C, Cumming RB. The effect of route of infection and strain of virus on the pathology of Australian infectious bronchitis. *Aust Vet J*. 1983; 60(7):209–13.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Ame J Hyg*. 1938; 27(3):493–7.
- Roy CJ, Milton DK. Airborne transmission of communicable infection--the elusive pathway. *N. Engl J Med*. 2004; 350(17):1710–2.
- Ryan E, Wright C, Gloster J. Measurement of airborne foot-and-mouth disease virus: Preliminary evaluation of two portable air sampling devices. *Vet J*. 2009; 179(3):458–61.
- Sattar SA, Ijaz MK. Spread of viral infections by aerosols. *Crit. Rev. Environ Control*. 1987; 17:89–131.
- Sattar SA, Ijaz MK. Airborne Viruses. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland J, Lipson D, Mills A, Stetzenbach L. Hrsg. *Manual of Environmental Microbiology*. 3. Aufl. Washington: American Society for Microbiology; 2007. 1016–30.
- Sayer WJ, MacKnight NM, Wilson HW. Hospital airborne bacteria as estimated by the Andersen sampler versus the gravity settling culture plate. *Am J Clin Pathol*. 1972; 58(5):558–66.
- Schoenbaum MA, Zimmerman JJ, Beran GW, Murphy DP. Survival of pseudorabies virus in aerosol. *Am J Vet Res*. 1990; 51(3):331–3.
- Schöttker-Wegner HH, Bötcher L, Nöckler A, Jeske C. Testvergleich im Rahmen der Newcastle-Disease-Impfüberwachung bei Puten. Tagungsband der 27. Fachtagung des Arbeitskreises für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID); 2008 Sep 18-21
- Seedorf J, Hartung J. Stäube und Mikroorganismen in der Tierhaltung. *KTBL Schrift* 393 2002.
- Sellers RF, Herniman KA. The effects of spraying on the amounts of airborne foot-and-mouth disease virus present in loose-boxes. *J Hyg (Lond)* 1972; 70(3):551–6.
- Sellers RF, Herniman KA. The airborne excretion by pigs of swine vesicular disease virus. *J Hyg (Lond)* 1974; 72(1):61–5.
- Sellers RF, Parker J. Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J Hyg (Lond)* 1969; 67(4):671–7.
- Shipe EL, Tyler ME, Chapman DN. Bacterial aerosol samplers. II. Development and evaluation of the Shipe sampler. *Appl Microbiol*. 1959; 7:349–54.
- Spalatin J, Turner AJ, Hanson RP. Observations on the transmissibility of lentogenic strains of Newcastle disease virus: significance of variables. *Avian Dis*. 1976; 20(2):361–8.

- Spendlove JC, Fannin KF. Methods of characterization of virus aerosols. In: Gerba C, Goyal S, Hrsg. *Methods in Environmental Virology*: Taylor & Francis Ltd; 1982: 261–329.
- Stärk KD. The role of infectious aerosols in disease transmission in pigs. *Vet J*. 1999; 158(3):164–81.
- Stolze B, Kaaden OR. Efficient medium for impingement and storage of enveloped viruses. *ZBL Vet Med B*. 1989; 36(3):161–7.
- Trouwborst T, Kuyper S, Jong JC de, Plantinga AD. Inactivation of some bacterial and animal viruses by exposure to liquid-air interfaces. *J Gen Virol*. 1974b; 24(1):155–65.
- Trouwborst T, Winkler KC. Protection against aerosol-inactivation of bacteriophage T 1 by peptides and amino acids. *J Gen Virol*. 1972b; 17(1):1–11.
- Tseng C, Li C. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *J Aerosol Sci*. 2005; 36:593–607.
- Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solórzano A, Swayne DE et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005; 310(5745):77–80.
- TYLER ME, SHIPE EL. Bacterial aerosol samplers. I. Development and evaluation of the all-glass impinger. *Appl Microbiol*. 1959; 7:337–49.
- Valarcher J, Gloster J, Doel CA, Bankowski B, Gibson D. Foot-and-mouth disease virus (O/UKG/2001) is poorly transmitted between sheep by the airborne route. *Vet J*. 2008; 177(3):425–8.
- van den Berg TP. Birnaviridae. In: Pattison M, McMullin PF, Bradbury JM, Alexander DJ, Hrsg. *Poultry diseases*. 6. Aufl. Edinburgh: Saunders Elsevier; 2008a: 359–66.
- van den Berg TP, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol*. 1991; 20(3):409–21.
- Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, Paepe A de et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3(7):RESEARCH0034.
- Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 2002; 296(5567):557–9.
- Wambura P, Meers J, Spradbrow P. Development of a cell culture method for quantal assay of strain I-2 of Newcastle disease virus. *Vet Res. Commun*. 2006; 30(6):689–96.
- Wang Z, Reponen T, Grinshpun SA, Gorny RL. Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection. *J Aerosol Sci*. 2001; 32(661-674).
- Waterfall CM, Eisenthal R, Cobb BD. Kinetic characterisation of primer mismatches in allele-specific PCR: a quantitative assessment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 299(5):715–22.
- Weesendorp E, Landman WJM, Stegeman A, Loeffen WLA. Detection and quantification of classical swine fever virus in air samples originating from infected pigs and experimentally produced aerosols. *Vet Microbiol*. 2008; 127(1-2):50–62.
- Wiesner, Ribbeck. *Lexikon der Veterinärmedizin*. 4. Aufl. Stuttgart: Enke; 2000.
- Wilkinson PJ, Donaldson AI, Greig A, Bruce W. Transmission studies with African swine fever virus. Infections of pigs by airborne virus. *J Comp Pathol*. 1977; 87(3):487–95.
- Willeke K. Improved Aerosol Collection by Combined Impaction and Centrifugal Motion. *Aerosol Sci Technol*. 1998; 28(5):439–56.
- Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(10):3741–51.

- Wit JJ de, van de Sande HWA, Counotte GHM, Wellenberg GJ. Analyses of the results of different test systems in the 2005 global proficiency testing schemes for infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus antibody detection in chicken serum. *Avian Pathol.* 2007; 36(2):177–83.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22(1):130-1, 134-8.
- Woeste K, Grosse Beilage E. Die Übertragung von Erregern des porcine respiratory disease complex (PRDC) zwischen den Schweineherden - eine Literaturübersicht. *Deut Tierarztl Woch.* 2007; 114(10):364–73.
- Zee YC, MacLachlan NJ. Paramyxoviridae. In: Hirsh, MacLachlan, Walker, Hrsg. *Veterinary Microbiology*. 2. Aufl. Ames: Blackwell Publishing; 2004. 369–76.
- Zeng Q, Westermark S, Rasmuson-Lestander A, Wang X. Detection and quantification of *Walleria sebi* in aerosols by real-time PCR, conventional PCR, and cultivation. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(12):7295–302.
- Zucker BA, Müller W. Untersuchungen zum Luftkeimhaushalt in Tierställen. 3. Mitteilung: Beziehungen zwischen einatembarem Endotoxin, einatembarem Staub und luftgetragenen Bakterien in einer Legehennenbatterie. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2000; 113:279–83.
- Zucker BA, Müller W. Untersuchungen zum Luftkeimhaushalt in Tierställen: Stabilität von Endotoxinen in der Umwelt. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2004; 117(1-2):6–11.
- Zucker BA, Trojan S, Müller W. Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses. *J Vet. Med B Infect Dis. Vet. Public Health* 2000; 47(1):37–46.

Anhang

I Abbildungen

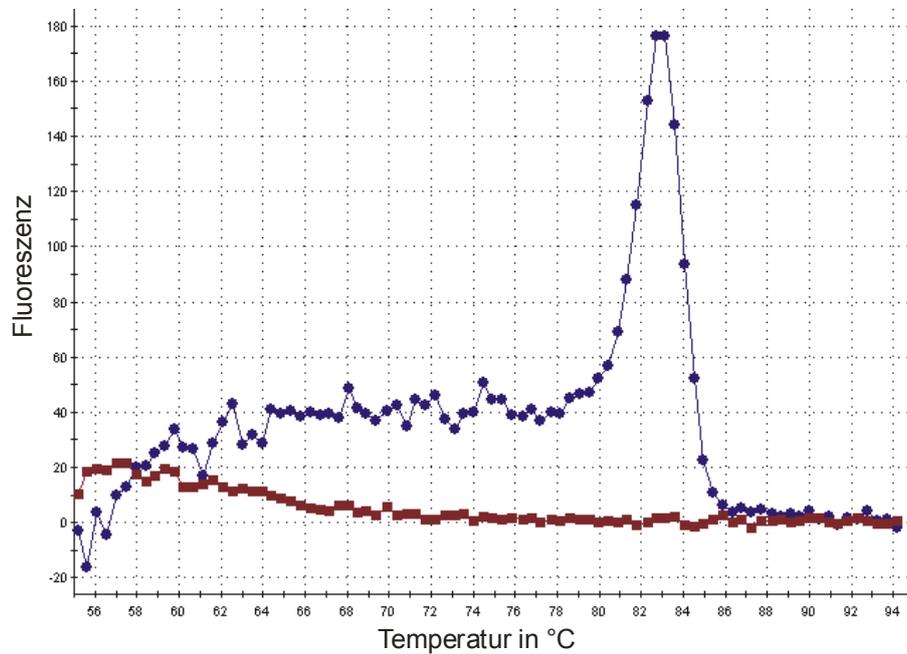


Abbildung 16: Schmelzkurvenanalyse für das Newcastle-Disease-Virus und mitgeführter Negativkontrolle. Die spezifische Schmelztemperatur liegt bei 83,2 °C.

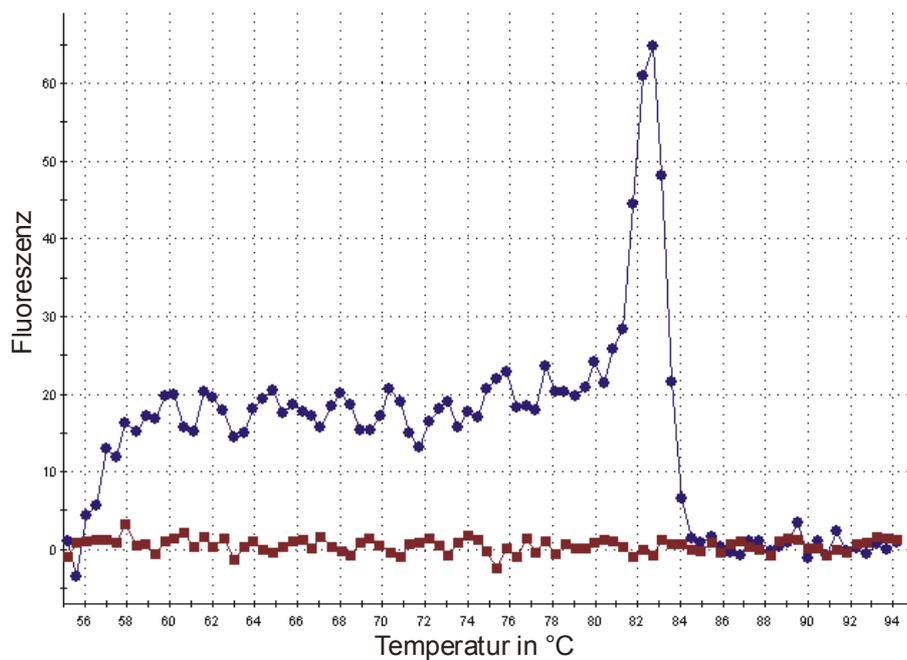


Abbildung 17: Schmelzkurvenanalyse für das Infektiöse-Bursitis-Virus und mitgeführter Negativkontrolle. Die spezifische Schmelztemperatur liegt bei 82,7 °C.

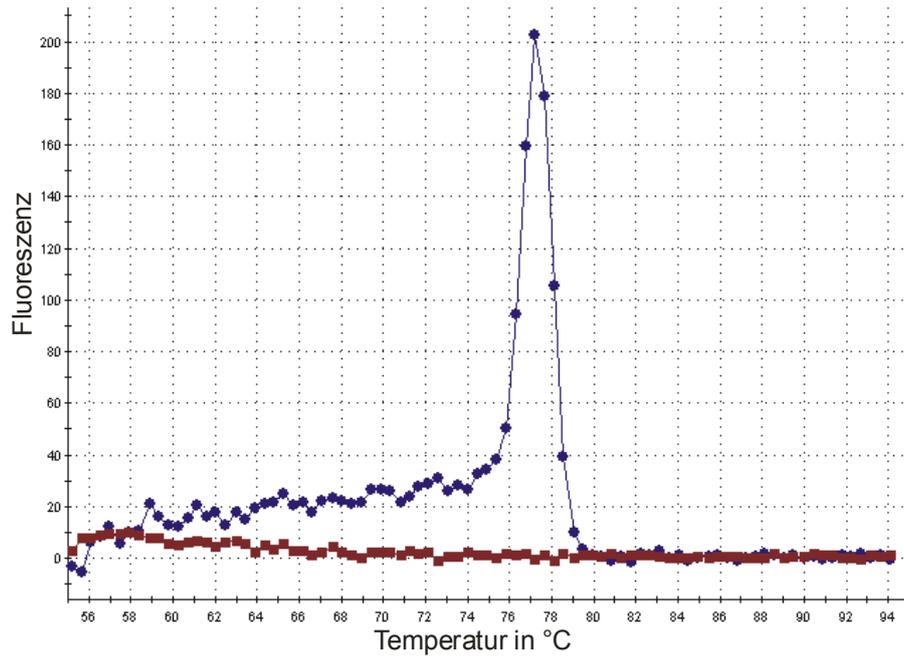


Abbildung 18: Schmelzkurvenanalyse für das Feline Calicivirus und mitgeführter Negativkontrolle. Die spezifische Schmelztemperatur liegt bei 77,2 °C.

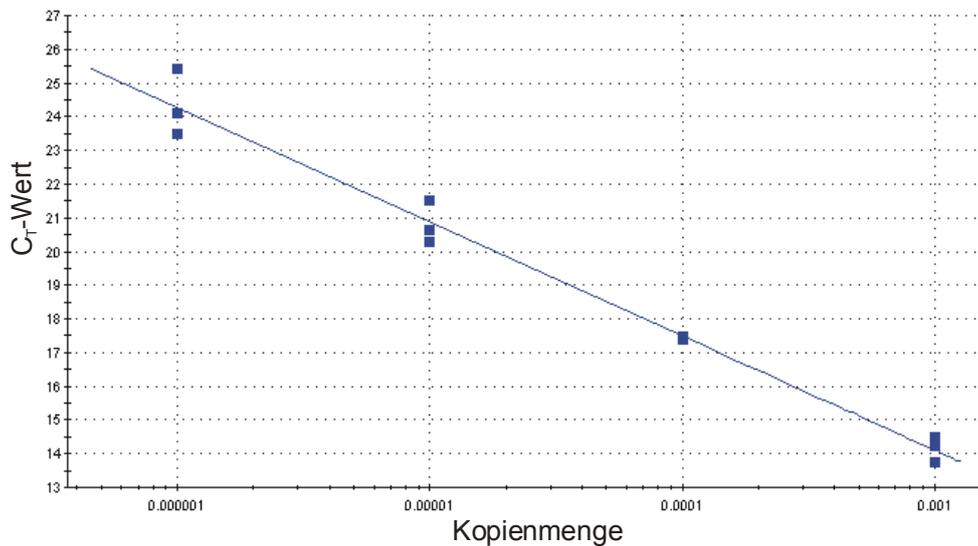


Abbildung 19: Effizienzbestimmung der Real-Time-PCR für das Newcastle-Disease-Virus mittels einer Standardkurve. Es erfolgten drei Reaktionen parallel und daraus die Bestimmung einer mittleren Effizienz von 97 %.

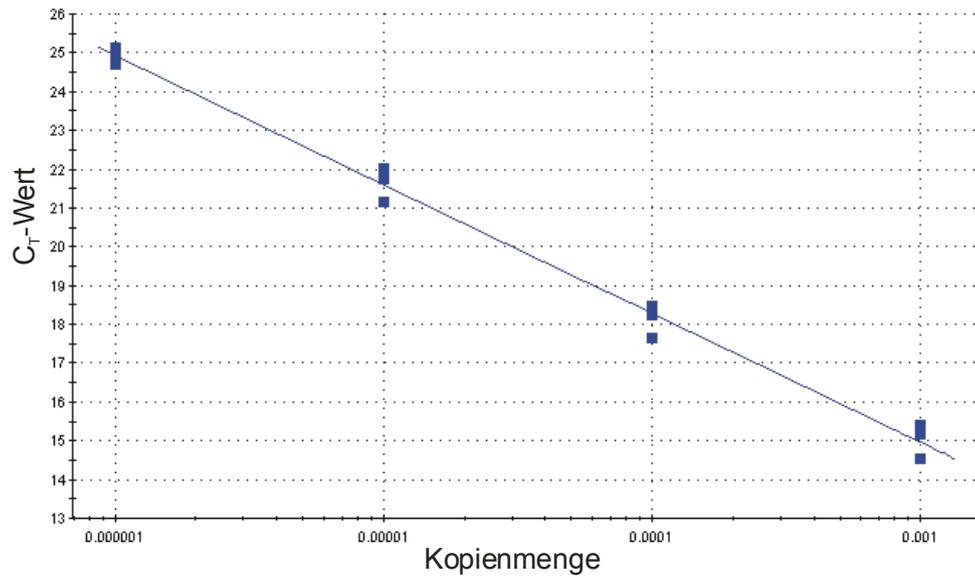


Abbildung 20: Effizienzbestimmung der Real-Time-PCR für das Infektiöse-Bursitis-Virus mittels einer Standardkurve. Es erfolgten drei Reaktionen parallel und daraus die Bestimmung einer mittleren Effizienz von 100 %.

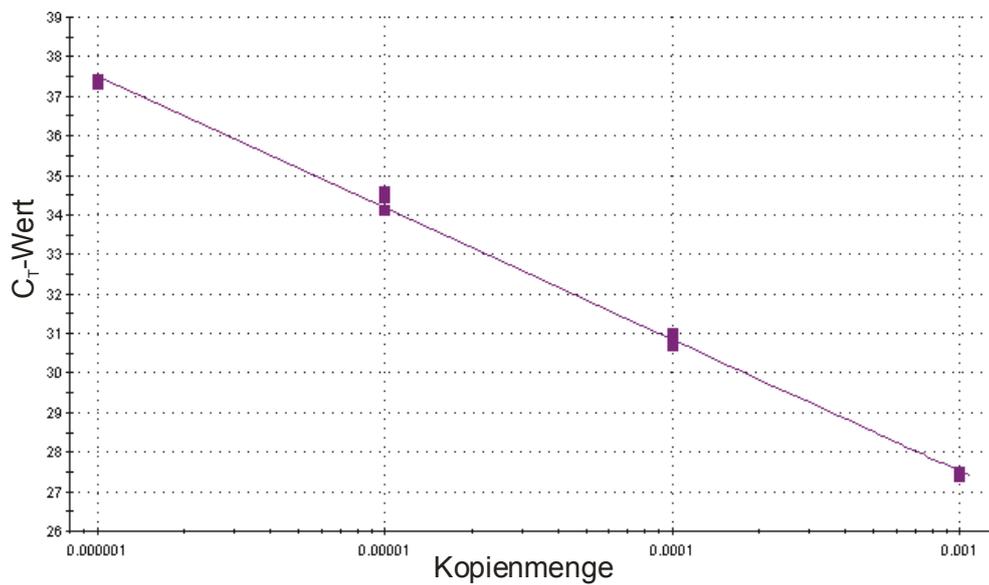


Abbildung 21: Effizienzbestimmung der Real-Time-PCR für das Feline Calicivirus mittels einer Standardkurve. Es erfolgten drei Reaktionen parallel und daraus die Bestimmung einer mittleren Effizienz von 99,5 %.

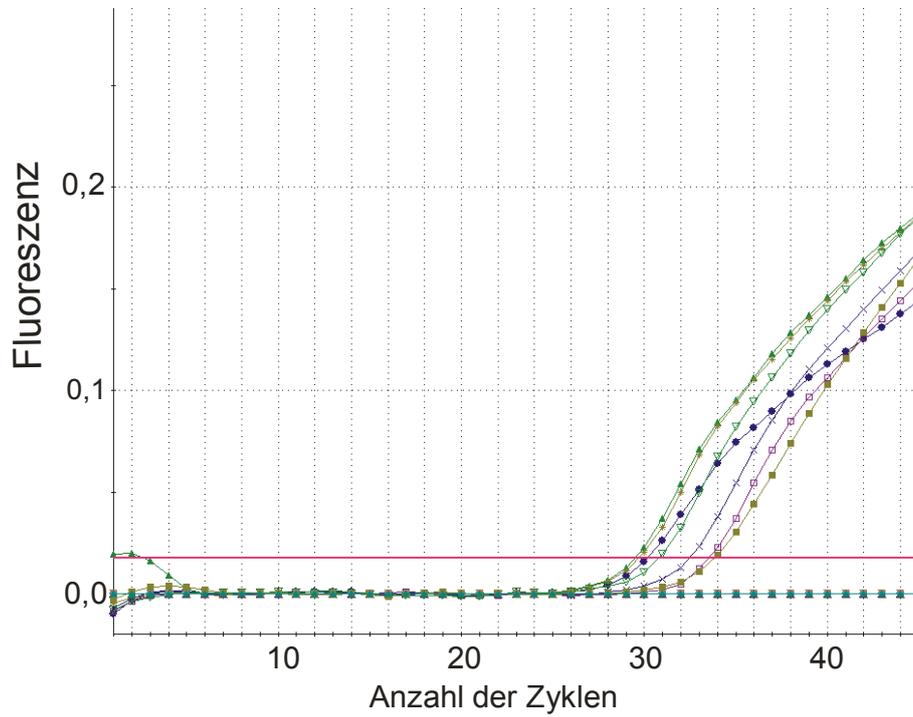


Abbildung 22: Amplifikationskurven des Referenzgens (FCV) der Calibratorprobe und von sechs Luftproben. Die blaue Kurve mit Kreissymbolen wird der Calibratorprobe zugeordnet, die drei Kurven mit kleineren C_T -Werten den Impingerproben, die drei mit höheren C_T -werten den Filterproben.

II Tabellen

Tabelle 17: Quantitative Bestimmung des Newcastle-Disease-Virus aus experimentell erzeugtem Aerosol bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten.

Virustiter in log (EID ₅₀ / m ³)				
Nachweis durch:	Impinger		Filter	
	Hühnerei	quant. PCR	Hühnerei	quant. PCR
hohe Luftfeuchtigkeit (ca. 85 %)	5,85	6,62	5,32	6,85
	5,68	6,40	5,19	7,58
	6,07	6,51	5,32	7,04
	6,15	5,31	5,49	6,95
	6,37	5,30	5,80	7,00
	6,06	5,83	5,65	6,60
	6,06	6,05	5,18	6,92
	6,20	5,70	5,15	7,54
	5,68	6,77	5,32	6,90
	6,15	5,88	5,34	7,08
	6,60	5,96	5,80	7,13
6,15	5,79	5,34	6,56	
niedrige Luftfeuchtigkeit (ca. 50 %)	5,93	5,47	5,87	6,72
	5,99	4,76	5,49	5,19
	6,20	4,48	6,01	6,92
	6,03	5,60	6,03	6,38
	5,99	5,41	5,49	6,20
	6,06	6,44	5,84	7,07

Anhang

Tabelle 18: Quantitative Bestimmung des Infektiösen-Bursitis-Virus aus experimentell erzeugtem Aerosol bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten.

Virustiter in log (TCID ₅₀ / m ³)				
Nachweis durch:	Impinger		Filter	
	Zellkultur	quant. PCR	Zellkultur	quant. PCR
hohe Luftfeuchtigkeit (ca. 85 %)	7,77	6,39	4,86	7,26
	7,92	6,63	4,63	8,16
	7,77	6,53	4,56	7,28
	8,07	7,44	4,33	7,03
	7,99	7,05	5,08	7,39
	7,62	7,41	3,73	8,32
	7,84	6,64	4,26	7,68
	7,69	6,84	4,18	7,89
	7,62	6,84	3,80	7,87
	7,62	7,33	4,26	8,30
	7,77	6,96	4,18	8,35
7,69	7,60	4,25	8,11	
niedrige Luftfeuchtigkeit (ca. 50 %)	7,17	6,70	4,10	6,58
	6,79	6,41	4,18	6,52
	6,87	5,97	3,58	6,73
	7,39	6,52	4,11	7,78
	7,24	6,64	4,11	7,40
	6,87	6,44	3,96	8,02

Tabelle 19: Nachweisgrenzen der Sammelgeräte für den Nachweis von NDV und IBDV aus der Luft. Die zu vernebelnde Ausgangsvirussuspension wurde verdünnt. Die Probenentnahme und -analyse fand analog den anderen Versuchen zum experimentell erzeugten Virusaerosol statt. n.n. steht für nicht nachgewiesen

Verdünnungsstufe der Virussuspension	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
NDV (in EID₅₀ / m³)				
Impinger				
<i>Hühnerei</i>	$10^{4,8}$	10^4	n.n.	n.n.
<i>Real-Time-PCR</i>	$10^{5,2}$	n.n.	n.n.	n.n.
Filter				
<i>Hühnerei</i>	$10^{4,8}$	n.n.	n.n.	n.n.
<i>Real-Time-PCR</i>	$10^{5,6}$	$10^{4,7}$	n.n.	n.n.
IBDV (in TCID₅₀ / m³)				
Impinger				
<i>Zellkultur</i>	$10^{6,4}$	$10^{5,7}$	$10^{4,55}$	n.n.
<i>Real-Time-PCR</i>	$10^{5,8}$	$10^{5,2}$	n.n.	n.n.
Filter				
<i>Zellkultur</i>	$10^{3,1}$	n.n.	n.n.	n.n.
<i>Real-Time-PCR</i>	10^6	$10^{5,2}$	$10^{3,8}$	n.n.

III Chemikalien und Reagenzien

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 015 M, pH 7,4

Aqua dest.:	1000 ml
Natriumchlorid (NaCl):	8,00 g
Kaliumchlorid (KCl):	0,20g
Dinatriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$):	1,15 g
Monokaliumphosphat (KH_2PO_4):	0,20 g
Calciumchlorid (CaCl):	0,10g
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$):	0,10 g

VI Berechnung des Korrekturfaktors des Luftdurchflusses

Der Luftdurchflussmesser zeigt mit Hilfe eines Kegels in einem senkrechten Rohr die Gasmenge an, die in einer bestimmten Zeit durch das Rohr strömt. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Skala bei 1 bar geeicht wurde und bei dem Messaufbau in dieser Arbeit dort ein Druck von etwa 1,5 bis 1,8 bar anlag. Dies führte zu einem anderen Volumendurchfluss. Der Korrekturfaktor soll im Folgenden hergeleitet werden.

Der reale Gasdurchfluss kann mit Hilfe der Bernoulli-Gleichung (GERTHSEN 1999)

$$\frac{\rho}{2} \times v^2 + \Delta p_{\text{statisch}} = \text{konstant} \quad (1)$$

berechnet werden. Dabei bezeichnet ρ die Dichte, welche laut idealer Gasgleichung (GERTHSEN 1999) proportional zum Druck p ist. $\Delta p_{\text{statisch}}$ ist die Druckdifferenz unter und über dem Kegel. Diese Differenz hängt von der Geometrie und der Gewichtskraft des Kegels ab und ist somit für die gleiche Kegelposition dieselbe. Der Volumendurchfluss V/t ist proportional zur Geschwindigkeit der Gasteilchen v . Dies kann in die Bernoulli-Gleichung eingesetzt werden, woraus folgt:

$$\frac{p_{\text{norm}}}{2} \times \left(\frac{V_{\text{norm}}}{t} \right)^2 = \frac{p_{\text{Rohr}}}{2} \times \left(\frac{V_{\text{Rohr}}}{t} \right)^2. \quad (2)$$

Nachdem das Gas den Durchflussmesser passiert, wird es über eine Düse in die Aerosolkammer gelassen. Dort expandiert es isotherm auf Normdruck p_{norm} . Mit Hilfe der idealen Gasgleichung kann dann das Volumen in der Aerosolkammer berechnet werden,

$$p_{\text{norm}} \times V_{\text{Kammer}} = p_{\text{Rohr}} \times V_{\text{Rohr}}. \quad (3)$$

Diese Gleichung nach V_{Rohr} umgestellt, in Gleichung (2) eingesetzt und die Wurzel gezogen ergibt:

$$\frac{V_{\text{Kammer}}}{t} = \sqrt{\frac{p_{\text{Rohr}}}{p_{\text{norm}}}} \times \frac{V_{\text{norm}}}{t} \quad (4)$$

Somit wurde gefunden, dass der wahre Gasfluss also der Wurzel des Druckes im Rohr (im Experiment am Druckanzeiger ablesbar) proportional ist. Der Wert des abgelesenen Gasflusses muss demnach mit der Wurzel des Druckes im Rohr (entspricht dem Korrekturfaktor) multipliziert und somit korrigiert wird. Für den typischen Fall, wo der eingestellte Druck 1,8 bar beträgt (entspricht einem Überdruck von 0,8 bar), muss der gemessene Gasfluss noch mit 1,34 multipliziert werden.

In dieser Betrachtung wurde die Abhängigkeit von der Temperatur vernachlässigt, da die Lufttemperatur sowohl im Durchflussmesser als auch in der Aerosolkammer gleich waren und nicht wie der Druck voneinander abwichen.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Angaben zu den Experimenten in der Aerosolkammer	30
Tabelle 2: Lochdurchmesser der Porenplatten des Andersen-Kaskaden-Impaktors und Teilchendurchmesser der bei den verschiedenen Stufen abgeschiedenen Partikel.	33
Tabelle 3: Primer- und SONDENSEQUENZEN sowie Zielgen der PCR-Reaktionen aller Viren.	35
Tabelle 4: Reaktionsbedingungen der Real-Time-PCR (a) des Newcastle-Disease-Virus, Infektiöse-Bursitis-Virus und Felinen Calicivirus und Pipettierschema (b) der Real-Time-PCRs aller verwendeten Viren.	36
Tabelle 5: Pipettierschema (a) und Thermocyclerprogramm (b) der Reversen Transkription.	38
Tabelle 6: Stalltemperaturen während der Haltung.	41
Tabelle 7: Volumen der Luftproben und Flussrate der Entnahme.	43
Tabelle 8: Probennahmeplan zur Untersuchung der Ausscheidung des Newcastle-Disease-Virus in die Luft von konventionellen Geflügelhaltungen.	46
Tabelle 9: Ergebnisse der Vorversuche mit dem Impinger.	51
Tabelle 10: Ergebnisse der Vorversuche mit dem Gelatinefilter.	51
Tabelle 11: Sammeleffizienzen beider Geräte mit zwei verschiedenen Nachweismethoden zur Detektion von NDV aus einem Virusaerosol.	53
Tabelle 12: Sammeleffizienzen beider Geräte mit zwei verschiedenen Nachweismethoden zur Detektion von IBDV aus einem Virusaerosol.	56
Tabelle 13: Vergleichende Darstellung der Detektionsraten beider Testviren.	58
Tabelle 14: Nachweisgrenzen des Impingers und Gelatinefilters bei der Detektion von NDV und IBDV aus experimentell erzeugtem Virusaerosol.	59
Tabelle 15: Lufttemperatur und relative Luftfeuchtigkeit der beprobten Ställe in Betrieb 1 und 2.	63
Tabelle 16: Ergebnisse anderer Studien zu Effizienzen von Impingern und Filtern für den Nachweis infektiöser Viren aus künstlich generierten Aerosolen.	71
Tabelle 17: Quantitative Bestimmung des Newcastle-Disease-Virus aus experimentell erzeugtem Aerosol bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten.	102
Tabelle 18: Quantitative Bestimmung des Infektiösen-Bursitis-Virus aus experimentell erzeugtem Aerosol bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten.	103
Tabelle 19: Nachweisgrenzen der Sammelgeräte für den Nachweis von NDV und IBDV aus der Luft.	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Funktionsweise einer TaqMan [®] -Sonde.	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Standardkurve in der Real-Time-PCR.	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung (a) des Apparaturaufbaus der Versuche mit experimentell erzeugten Virus aerosolen in einer Aerosolkammer und Foto (b) der Apparatur.	27
Abbildung 5: Relative Quantifizierung von sechs Luftproben des experimentell erzeugten Virus aerosols.	49
Abbildung 6: Prozentuale Größenverteilung der Partikel des experimentell erzeugten Virus aerosols.	50
Abbildung 7: Sammeleffizienzen der beiden Sammelgeräte zum Nachweis von NDV aus experimentell erzeugtem Virus aerosol.	52
Abbildung 8: Sammeleffizienzen der beiden Sammelgeräte zum Nachweis von infektiösem NDV aus experimentell erzeugtem Virus aerosol bei hoher (85 %) und niedriger (50 %) Luftfeuchtigkeit.	54
Abbildung 9: Prozentuale Sammeleffizienzen der beiden Geräte zum Nachweis von IBDV aus experimentell erzeugtem Virus aerosol.	55
Abbildung 10: Prozentuale Sammeleffizienzen der beiden Sammelgeräte zum Nachweis von infektiösem IBDV aus experimentell erzeugtem Virus aerosol bei hoher (85 %) und niedriger (50 %) Luftfeuchtigkeit.	57
Abbildung 11: Untersuchung der Rachen- und Kloakentupfer (2 Tupferpoolproben aus jeweils 10 Tupfern) auf NDV Stamm LaSota mittels Real-Time-PCR.	60
Abbildung 12: Untersuchung der Seren von Lebenstag 8 und 21 <i>p.vacc.</i> auf Antikörper gegen NDV mit zwei verschiedenen ELISA-Kits.	61
Abbildung 13: Untersuchung der Rachen- und Kloakentupfer (2 Tupferpoolproben aus jeweils 10 Tupfern) auf IBDV mittels Real-Time-PCR.	62
Abbildung 14: Untersuchung der Seren von Lebenstag 8 und 21 <i>p.vacc.</i> auf Antikörper gegen IBDV.	63
Abbildung 15: Stichprobenartige Untersuchung von Geflügelseren auf Antikörper gegen NDV aus zwei Betrieben mit konventioneller Haltung am Lebenstag 18 und 60.	65
Abbildung 16: Schmelzkurvenanalyse für das Newcastle-Disease-Virus und mitgeführter Negativkontrolle.	98
Abbildung 17: Schmelzkurvenanalyse für das Infektiöse-Bursitis-Virus und mitgeführter Negativkontrolle.	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 18: Schmelzkurvenanalyse für das Feline Calicivirus und mitgeführter Negativkontrolle.	99
Abbildung 19: Effizienzbestimmung der Real-Time-PCR für das Newcastle-Disease-Virus mittels einer Standardkurve.	99
Abbildung 20: Effizienzbestimmung der Real-Time-PCR für das Infektiöse-Bursitis Virus mittels einer Standardkurve.	100
Abbildung 21: Effizienzbestimmung der Real-Time-PCR für das Feline Calicivirus mittels einer Standardkurve..	100
Abbildung 22: Amplifikationskurven des Referenzgens (FCV) der Calibratorprobe und von sechs Luftproben.	101

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Truyen für die wissenschaftliche Betreuung des Themas sowie für die finanzielle Unterstützung während der gesamten Zeit. Besonderen Dank für motivierende Worte zur Arbeit in der Wissenschaft.

Herrn Prof. Rösler danke ich ebenfalls für die fachliche Unterstützung sowie für viele hilfreiche Tipps für den Start ins Arbeitsleben.

Ich bedanke mich bei unseren lieben Labordamen, Nadja Leinecker, Eveline Brumme, Dana Rüster und Nadine Roßner für viele Ratschläge im Laboralltag sowie für die stets gewährte Unterstützung. Es war eine Freude mit Euch zu pipettieren!

Frau Schneider gilt besonderen Dank für die tatkräftige Unterstützung bei allem Organisatorischen, was mir viel Zeit und vor allem Nerven erspart hat.

Für Hilfe beim Aufbau der Aerosoltechnik sowie bei der Versorgung meiner Hühner danke ich dem immer gut gelaunten Herrn Willig.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den betreuenden Tierärzten für die Möglichkeit und Unterstützung der Untersuchungen in den Geflügelbeständen.

Allen Mitdoktoranden und unserer Gastwissenschaftlerin Anna danke ich für die nette Zeit im und auch außerhalb des Instituts. An dieser Stelle wünsche ich auch allen viel Erfolg für die Zukunft.

Meiner Familie danke ich für die stets aufmunternden und anerkennenden Worte sowie ihr Verständnis für oft fehlende Zeit. Spezieller Dank gilt meinen Freunden, vor allem meinem Freund Lars für die geduldige Hilfe in mathematischen Fragen, vielen anderen Tipps rundum das Promovieren, aber besonders für die schöne Zeit neben der Arbeit.