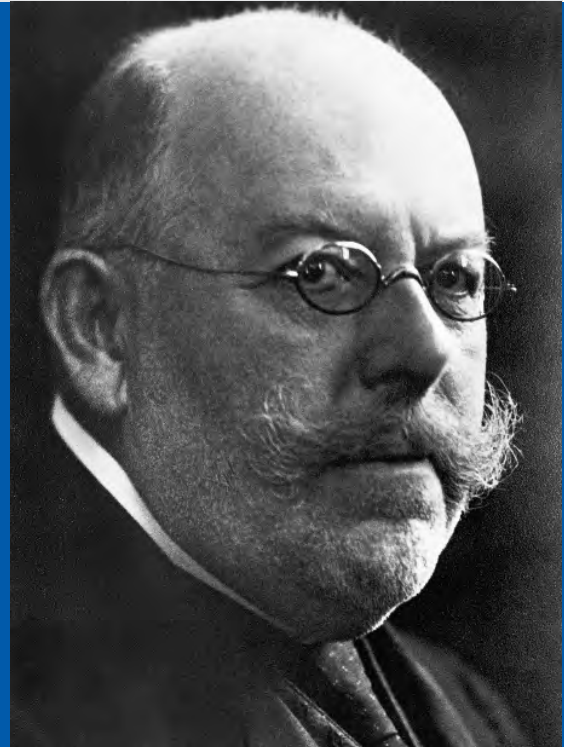


1910–2010



100 JAHRE

JAHRESBERICHT 2010



Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institut for Animal Health

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
BUNDEFORSCHUNGSINSTITUT FÜR TIERGESUNDHEIT

JAHRESBERICHT 2010

Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz

IMPRESSUM

Herausgeber
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Der Präsident
Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems
Telefon: 038351 70
Fax: 038351 7-1226; 7-1151
E-mail: poststelle@fli.bund.de
Internet: www.fli.bund.de

Präsident
Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. vet. h. c. Th. C. Mettenleiter

Redaktion
E. Reinking
A. Beidler
Dr. J. Schell (Kap IV, VI, VIII)

Abbildungen, Fotos
Friedrich-Loeffler-Institut, soweit nicht anders vermerkt

Satz
Druckhaus Panzig, Greifswald

Insel Riems, Mai 2011

ISSN 1861-0005

VORWORT

Sehr geehrte Damen und Herren,
Liebe Kolleginnen und Kollegen,

das Jahr 2010 war von einem besonderen Ereignis in der Geschichte des Friedrich-Loeffler-Instituts geprägt: am 10. Oktober 2010 feierte das Institut sein einhundertjähriges Gründungsjubiläum. 100 Jahre Forschung für die Tiergesundheit, vom Institut zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bis zum Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit im Ressort des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz durchlief das FLI eine wechselvolle Geschichte. Diese Geschichte, die gleichzeitig Wissenschaftshistorie und Zeitgeschichte dokumentiert, wird in dem neuen Buch „Das Friedrich-Loeffler-Institut 1910 – 2010, 100 Jahre Forschung für die Tiergesundheit“ von Annette Hinz-Wessels und Jens Thiel umfassend dargestellt. Mit dem ersten Laborgebäude Loefflers auf der Insel, dem „Loeffler-Haus“, wurde zum Jubiläum nicht nur ein Kleinod restauriert, sondern auch in einer darin untergebrachten Ausstellung das Wirken Loefflers gewürdigt. Über 8000 Besucherinnen und Besucher nutzten die Einladung des FLI zu einem Tag der offenen Tür am Hauptsitz Insel Riems, um sich über aktuelle Forschungsarbeiten aller FLI-Institute und die zukunftsweisenden Neubauten zu informieren. Dies war auch seitens des Instituts eine logistische Leistung, zu der viele Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter beitragen haben. Eine feierliche Abendveranstaltung, u. a. mit Ansprachen von Bundesministerin Ilse Aigner und des Generaldirektors der Weltorganisation für Tiergesundheit OIE, Dr. Bernard Vallat, rundete diesen Festtag würdig ab. Ein ganz besonderes Ereignis war die Herausgabe der Sonderbriefmarke „100 Jahre Friedrich-Loeffler-Institut“, die in sechs Millionen Exemplaren nunmehr deutschlandweit als „Werbeträger“ für Friedrich Loeffler und das FLI fungiert.



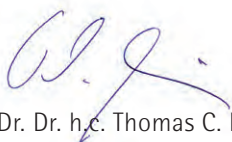
Allen Beteiligten möchte ich an dieser Stelle noch einmal für ihr Engagement danken. Ohne ihre Hilfe wäre dieser einmalige Jubiläumstag nicht so erfolgreich verlaufen. Und ohne die Mitarbeit aller Beschäftigten könnte das FLI nicht auf nunmehr 100 Jahre erfolgreiche Forschung für die Tiergesundheit zurückblicken. Auch hierfür meinen herzlichen Dank. Es war ein „großer Tag“ für das FLI...aber einmal alle 100 Jahre genügt!

Dass uns im letzten Jahr aber nicht nur das Jubiläum beschäftigte, zeigt Ihnen der vorliegende Jahresbericht. Das FLI hat sich in der ganzen Breite der „Tiergesundheit“ wissenschaftlich etabliert und wird als zentrale Forschungseinrichtung wahrgenommen. Von der Maul- und Klauenseuche bis zu den Sitzstangen der Legehennen, von Rotz (auch dieser Erreger wurde von Loeffler erstmals beschrieben) zu „Klontieren“, das FLI forscht umfassend.

Für das FLI wird auch die Zukunft unter dem Motto „Forschung für die Tiergesundheit“ stehen. Hierfür sind wir mit dem Neubau auf der Insel Riems, den wir dieses Jahr beziehen, sowie den geplanten Ausbaumaßnahmen an den Standorten Jena und Mariensee gut aufgestellt.

Wir haben uns entschlossen, unseren Jahresbericht 2010 primär in elektronischer Form zur Verfügung zu stellen und hoffen, dass dies auf Ihre Zustimmung trifft. Bei der Lektüre wünsche ich Ihnen viel Vergnügen und das eine oder andere „Aha“-Erlebnis!

Mit besten Grüßen
Ihr



Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter

INHALTSVERZEICHNIS

I.	AUFGABEN	7
II.	ÜBERBLICK	9
	Organisation	10
	Die Institute	12
	Organigramm	19
	Beschäftigte	20
III.	AUSGEWÄHLTE SCHWERPUNKTTHEMEN	23
	INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (IMB)	
	Morphogenese und intraneuronale Ausbreitung neurotroper Viren	24
	INSTITUT FÜR VIRUSDIAGNOSTIK (IVD)	
	Molekulare Epidemiologie porciner Influenzaviren in Deutschland seit 2009	30
	INSTITUT FÜR INFEKTIONSMEDIZIN (IMED)	
	Ranaviren - Taxonomie, Replikation und Diagnostik	37
	INSTITUT FÜR NEUE UND NEUARTIGE TIERSEUCHENERREGER (INNT)	
	Das Rift-Valley-Fieber-Virus	42
	INSTITUT FÜR TIERERNÄHRUNG (ITE)	
	Konjugierte Linolsäuren (CLA) in der Milchviehernährung	47
	INSTITUT FÜR TIERSCHUTZ UND TIERHALTUNG (ITT)	
	Prävalenz und Schweregrad von Fußballendermatitis in der Geflügelmast in Abhängigkeit von der Einstreuart	53
	INSTITUT FÜR BAKTERIELLE INFEKTIONEN UND ZOOSEEN (IBIZ)	
	<i>Clostridium Difficile</i> , ein Potentiell zoonotischer Enteritiserreger	57
	INSTITUT FÜR MOLEKULARE PATHOGENESE (IMP)	
	Nutztiermodelle für die interdisziplinäre biomedizinische Forschung	60
	INSTITUT FÜR NUTZTIERGENETIK (ING)	
	Sortnetz Mariensee: Alternative Ansätze zur geschlechtsspezifischen Selektion von Bullenspermien	66
	INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE (IFI)	
	Die Entwicklung von der Peptidvakzine zur DNA-Vakzine	70
	INSTITUT FÜR EPIDEMIOLOGIE (IFE)	
	Ansteckende Blutarmut der Einhufer – Die Spitze eines Eisbergs?	78
	ARBEITSGRUPPE INTERNATIONALE TIERGESUNDHEIT (AG-ITG)	
	Der Mensch als Hauptfaktor in der lokalen und globalen Verbreitung der afrikanischen Schweinepest	82
IV.	LAUFENDE FORSCHUNGSPROJEKTE	87
	1 Viren	88
	1.1. DNA VIREN	88
	1.1.1 Familie <i>Herpesviridae</i>	88
	1.1.2 Familie <i>Alloherpesviridae</i>	93
	1.2 RNA VIREN	94
	1.2.1 Familie <i>Reoviridae</i>	94
	1.2.2 Familie <i>Rhabdoviridae</i>	95
	1.2.3 Familie <i>Paramyxoviridae</i>	98
	1.2.4 Familie <i>Orthomyxoviridae</i>	98
	1.2.5 Familie <i>Bunyaviridae</i>	103

1.2.6 Familie <i>Picornaviridae</i>	104
1.2.7 Familie <i>Hepeviridae</i>	104
1.2.8 Familie <i>Flaviviridae</i>	105
2 Bakterien	109
2.1 Clostriden	109
2.2 Salmonellen	109
2.3 Chlamydien	110
2.4 Mykobakterien	112
2.5 Mykoplasmen	113
2.6 <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	114
2.7 Coxiellen	114
2.8 Bakterielle Resistenzforschungen	115
3 PARASITEN	119
3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	119
3.2 <i>Neospora caninum</i>	120
3.3 <i>Besnoitia besnoiti</i>	121
3.4 <i>Echinococcus multilocularis</i>	121
4 Prionkrankheiten	122
5 Immunologie	124
5.1 Immunologische Grundlagen	125
5.2 Allgemeine Impfstoffentwicklung und Immuntherapie	126
5.3 Immunsystem der Fische	127
6 Tierernährung	129
6.1 Futtermittelzusatzstoffe	129
6.2 Mykotoxine	130
6.3 Nebenprodukte der Biokraftstoffherstellung	131
7 Tierschutz und Tierhaltung	132
7.1 Geflügelhaltung	132
7.2 Schweinehaltung	135
8 Züchtung und genetische Ressourcen	135
8.1 Monitoring, Charakterisierung und Erhaltung tiergenetischer Ressourcen	135
8.2 Biotechnologie	137
8.3 Funktionelle Genetik und Bioregulation	141
9 Weitere Arbeitsgebiete	143
9.1 Pathophysiologie	143
9.2 Arbeitsgruppe internationale Tiergesundheit	143
9.3 Informatik, Biostatistik, Dokumentation	144
9.4 Sammlung von Zelllinien in der Veterinärmedizin	145
9.5 Virusbank	145
Nationale und internationale Forschungsverbünde und Exzellenznetzwerke	146
V. BEHÖRDLICHE AUFGABEN	149
1 Aufgaben im Rahmen des Gentechnikrechts	150
2 Nationale Referenzlaboratorien	150

	3 Rechtliche Grundlagen der Tierseuchenbekämpfung	170
	3.1 Anzeigepflichtige Tierseuchen	170
	3.2 Meldepflichtige Tierkrankheiten	173
	3.3 Weitere nationale Referenzlabore am FLI	173
VI.	ORGANISIERTE VERANSTALTUNGEN	175
VII.	PRESSE- UND ÖFFENTLICHKEITSARBEIT	179
VIII.	KOOPERATIONEN MIT HOCHSCHULEN UND MITARBEIT IN WISSENSCHAFTLICHEN GREMIEN	183
	1 Vorlesungs- und Hochschultätigkeit	184
	2 Wissenschaftlichen Gremien	186
IX.	PUBLIKATIONEN	189
	1 Veröffentlichungen des Friedrich-Loeffler-Instituts	190
	2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen	190
	2.1 Wissenschaftliche Publikationen (Peer-Reviewed)	190
	2.2 Weitere wissenschaftliche Publikationen	203
	2.3 Bücher und Buchbeiträge	207
	3 Arbeiten zur Erlangung eines akademischen Grades, Auszeichnungen und Preise	208
	3.1 Dissertationen	208
	3.2 Diplomarbeiten	210
	3.3 Masterarbeiten	210
	3.4 Bachelorarbeiten	210
	4 Redaktionelle Mitarbeit in wissenschaftlichen Zeitschriften	211

I. AUFGABEN

Die Gesundheit und das Wohlbefinden landwirtschaftlicher Nutztiere stehen im Mittelpunkt der Arbeiten des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI). Hinzu kommt der Schutz des Menschen vor Zoonosen, d. h. zwischen Tieren und Mensch übertragbaren Infektionen. Das FLI ist eines der vier Bundesforschungsinstitute und selbständige Bundesoberbehörde im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV).

Im Rahmen der Politikberatung erarbeitet das Institut wissenschaftliche Grundlagen, Gutachten und Stellungnahmen als Entscheidungshilfen zu allen Fragen der Tiergesundheit. Rund 950 Beschäftigte, davon etwa 150 Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler auf Planstellen und 150 Beschäftigte auf befristeten Drittmittelstellen, arbeiten in elf Fachinstituten an sieben Standorten. Der Jahreshaushalt beläuft sich ohne Drittmittel auf etwa 50 Millionen Euro.

In den Fachdisziplinen Bakteriologie, Epidemiologie, Ethologie, Genetik, Immunologie, Parasitologie, Physiologie und Virologie forscht das FLI unter Einbeziehung verwandter Wissenschaften sowohl grundlagen- als auch praxisorientiert. Ziele der Forschung sind der Schutz vor Infektionskrankheiten durch eine bessere und schnellere Diagnose, die Erarbeitung von Maßnahmen zur Prävention sowie das Schaffen von Grundlagen für moderne Bekämpfungsstrategien bei Tierseuchen und Zoonosen, die Entwicklung tierschutzgerechter Haltungssysteme, der Erhalt der genetischen Vielfalt bei Nutztieren und die effiziente Verwendung von Futtermitteln für die Erzeugung qualitativ hochwertiger Lebensmittel tierischer Herkunft.

Die Aufgaben des FLI bezüglich Tierseuchen und Zoonosen sind in § 4 des Tierseuchengesetzes, in § 2 der Tierimpfstoffverordnung sowie in § 16 Abs. 4 des Gentechnikgesetzes festgelegt.

Nach dem Tierseuchengesetz (in der Fassung vom 22.06.2004) fungiert das FLI gemeinsam mit dem Paul-Ehrlich-Institut als Zulassungsbehörde für Sera, Impfstoffe,

Antigene und Nachweismethoden. Am FLI steht dabei die Zulassung veterinärmedizinischer Infektionsdiagnostika im Vordergrund. Im Jahr 2010 wurden insgesamt 19 Zulassungen und 375 Chargenfreigaben vorgenommen.

Als zuständige Bundeseinrichtung betreibt das FLI über 50 nationale Referenzlaboratorien für anzeigepflichtige Tierseuchen. Die Referenzlaboratorien sind nach ISO/IEC 17025 akkreditiert. Sie klären Verdachtsfälle ab, beraten die Veterinärbehörden und führen Ringversuche oder ähnliche Maßnahmen zur Qualitätssicherung der Tierseuchendiagnostik in Deutschland durch. Im Rahmen dieser Tätigkeit veröffentlicht das FLI eine Sammlung amtlicher Verfahren zur Probenahme und Untersuchung auf anzeigepflichtige Tierseuchen sowie den Tiergesundheitsjahresbericht.

Auf internationaler Ebene führt das FLI Referenzlaboratorien der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) für Aviäre Influenza, Bovine Herpesvirus 1-Infektion, Brucellose, Chlamydiose, Enzootische Rinderleukose, Newcastle Disease, Rotz und Tollwut. Weiterhin ist das FLI „Collaborating Centre for Zoonoses in Europe“ des OIE und führt ein „Collaborating Centre“ der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für Tollwut.

Nach der Tierimpfstoff-Verordnung (in der Fassung vom 22.06.2004) ist das FLI Zulassungsstelle für Mittel gegen eine Reihe von Tierseuchen, darunter Maul- und Klauenseuche, Schweinepest und Lungenseuche der Rinder. Außerdem fungiert das FLI als Zulassungsstelle für veterinärmedizinische Testsera, Testantigene und Testallergene, ausgenommen Tuberkuline.

Nach dem Gentechnikgesetz (in der Fassung vom 21.12.2004) ist das FLI Einvernehmensbehörde bei Verfahren zur Freisetzung bzw. zum Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Tieren sowie von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, die an Tieren angewendet werden sollen. Im Zusammenhang mit dieser Aufgabe ist das FLI auch beratend bei der Fortschreibung des Gentechnikrechtes sowie allgemeinen Fragen der biologischen Sicherheit tätig.

II. ÜBERBLICK

ORGANISATION

HAUPTSITZ INSEL RIEMS

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10
17493 Greifswald-Insel Riems
Tel.: (038351) 7-0
Fax: (038351) 7-1219, 7-1151, 7-1226

Institut für Molekularbiologie
Institut für Virusdiagnostik
Institut für Infektionsmedizin
Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger
Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit

Leitung: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. C. Mettenleiter, Präsident und Professor
Vertreter im Amt: PD Dr. F.J. Conraths, Direktor und Professor
Forschungsreferent: Dr. J. Schell
Referentin für Presse- und Öffentlichkeitsarbeit: Dipl. Biol. E. Reinking
Verwaltungsleiter: Leitender Regierungsdirektor D. Nobis

STANDORT BRAUNSCHWEIG

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Tel.: (0531) 596-3102
Fax: (0531) 596-3199, -3299

Institut für Tierernährung

Örtl. admin. Vertreter des Präsidenten: Prof. Dr. Dr. S. Dänicke, Direktor und Professor
Örtl. Verwaltung: B. von Hörsten, W. Müller

STANDORT CELLE

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Dörnbergstraße 25 + 27
29223 Celle
Tel.: (05141) 3846-0
Fax: (05141) 3846-117

Institut für Tierschutz und Tierhaltung

Örtl. admin. Vertreter des Präsidenten: Dr. L. Schrader, Direktor und Professor
Örtl. Verwaltung: B. von Hörsten, W. Müller

STANDORT JENA

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Naumburger Str. 96a
07743 Jena
Tel.: (03641) 804-0
Fax: (03641) 804-2228, 804-2350

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
Institut für molekulare Pathogenese

Örtl. admin. Vertreter des Präsidenten: Prof. Dr. H. Neubauer, Direktor und Professor
Örtl. Verwaltungsleiter: T. Honnef

STANDORT MARIENSEE

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Höltystraße 10
31535 Neustadt
Tel.: (05034) 871-0
Fax: (05034) 871-143

Institut für Nutztiergenetik

Örtl. admin. Vertreter des Präsidenten: Prof. Dr. H. Niemann, Direktor und Professor
Örtl. Verwaltung: B. von Hörsten, W. Müller

STANDORT TÜBINGEN

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Paul-Ehrlich-Str. 28
72076 Tübingen
Tel.: (07071) 967-0
Fax: (07071) 967-105, 967-303, 967-305

Institut für Immunologie

Örtl. admin. Vertreter des Präsidenten: Prof. Dr. L. Stitz, Direktor und Professor
Örtl. Verwaltungsleiter: Regierungsamtmann K. Heberle

STANDORT WUSTERHAUSEN

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Seestr. 55
16868 Wusterhausen
Tel.: (033979) 80-0
Fax: (033979) 80-200, 80-222

Institut für Epidemiologie

Örtl. admin. Vertreter des Präsidenten: PD Dr. F.J. Conraths, Direktor und Professor
Örtl. Verwaltungsleiterin: Regierungsamtfrau B. Krause



DIE INSTITUTE

INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (IMB)

Das **Institut für Molekularbiologie** führt molekulare Analysen tierpathogener Viren durch und forscht an der Aufklärung der Interaktionen zwischen Virus und Wirtszelle auf molekularer Ebene. Schwerpunkte bilden animale Herpesviren (Pseudorabiesvirus, Bovines Herpesvirus 1, Virus der infektiösen Laryngotracheitis, Koi-Herpesvirus), Rhabdoviren (Tollwut- und Tollwutverwandte Viren), Orthomyxoviren (Influenza), Paramyxoviren (Newcastle Disease Virus) sowie das zu den *Asfarviridae* zählende Virus der afrikanischen Schweinepest. Mittels molekularvirologischer und zellbiologischer Techniken werden Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung viraler Genprodukte sowie zur Interaktion mit zellulären Proteinen durchgeführt. Die gezielte Herstellung spezifischer Virusmutanten durch gentechnische Methoden (Klonierung kompletter viraler Genome als bakterielle artifizielle Chromosomen, BAC; reverse Genetik von RNA Viren inklusive aviärer Influenzaviren) bildet dabei die Grundlage. Am Institut ist eine Proteomanalyseplattform mit 2-D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) sowie eine Live-Cell Imaging Plattform zur Beobachtung virologisch-zellbiologischer Prozesse in Echtzeit etabliert.

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. Dr. h. c. Th. C. Mettenleiter

Vertretung: Direktor und Professor Dr. G. Keil

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Direktor PD Dr. S. Finke, Wiss. Oberrat Dr. W. Fuchs, Wiss. Oberrat Dr. A. Karger, Wiss. Oberrätin Dr. B. Klupp, Wiss. Oberrätin Dr. A. Römer-Oberdörfer, Dr. J. Stech, Dr. J. Veits, Dr. S. Weber

Drittmittelbeschäftigte:

S. Abdel-Whab, C. Allin, A. Bauer, J. Bogs, K. Grimm, S. Gohrbandt, J. Heinrich, J. Hundt, K. Klingbeil, A. Kreibich, B. Möhl, F. Müller, A. Negatsch, J. Orbanz, N. Osman, S. Pavlova, R. Pollin, Dr. R. Portugal, K. Ramp, F. Schuster, M. Skiba, Dr. O. Stech, C. Steglich, S. Warlich

INSTITUT FÜR VIRUSDIAGNOSTIK (IVD)

Das **Institut für Virusdiagnostik** bearbeitet veterinärmedizinisch bedeutsame Viruserkrankungen bei Nutztieren vorrangig aus diagnostischer und differenzialdiagnostischer Sicht. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf anzeigepflichtigen Tierseuchen. Im Institut werden daher eine Reihe Na-

tionaler Referenzlaboratorien geführt, u. a. für Klassische Schweinepest, Geflügelpest, Newcastle Disease, Infektionen mit Bovinem Herpesvirus Typ 1, Infektiöse Anämie der Einhufer, Maul- und Klauenseuche, Vesikuläre Schweinekrankheit, Afrikanische Schweinepest und Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease. Hinzu kommen Referenzlabore für exotische Tierseuchen wie die Pest der Kleinen Wiederkäuer, Lumpy-Skin-Krankheit, Rinderpest oder Affenpocken. Die Laboratorien für Geflügelpest, Newcastle Disease und BHV-1 sind zudem als Referenzstellen der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) anerkannt. Im Institut werden Verfahren für die Diagnose virusbedingter Tierkrankheiten erarbeitet, verbessert und validiert, Zulassungsuntersuchungen von Diagnostika entsprechend Tierseuchengesetz vorgenommen sowie neue oder kommerziell nicht verfügbare Labordiagnostika entwickelt und bereitgestellt. Außerdem betreibt das IVD Prophylaxe- und Pathogeneseforschung sowie phylogenetische Analysen bei ausgewählten Erregern, beispielsweise für Schweinepest, Maul- und Klauenseuche sowie Aviäre Influenza. Labore für die Molekularbiologie, Sequenzierung, Microarray Analyse und automatisierte Nukleinsäureextraktion komplettieren das Institutsspektrum.

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. M. Beer

Vertretung: Direktor und Professor Dr. H. Schirrneier

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dr. S. Blome, Wiss. Oberrat Dr. M. Dauber, Wiss. Direktor Dr. K. R. Depner, Wiss. Oberrat PD Dr. C. Grund, Wiss. Direktor Dr. B. Haas, Wiss. Direktor Prof. Dr. T. Harder, Dr. D. Höper, Wiss. Oberrat Dr. B. Hoffmann, Dr. P. König, Dr. I. Reimann, E. Starick, H.-G. Strebelow

Drittmittelbeschäftigte:

B. Abendroth, K. Brehm, A. Breithaupt, M. Eschbaumer, C. Gabriel, K. Goller, J. Hänel, Dr. D. Kalthoff, I. Leifer, K. Mischkale, I. Müller, Dr. A. Postel, M. Richter, S. Röhrs, Dr. M. Rudolf, M. Scheuch, A. Wegelt, K. Wernike, J. Zemke

INSTITUT FÜR INFEKTIONSMEDIZIN (IMED)

Im **Institut für Infektionsmedizin** steht angewandte Forschung zur Ätiologie und Pathogenese viral, bakteriell und mykologisch bedingter Krankheiten bei Nutztieren im Mittelpunkt. Ziele der Arbeiten sind die Optimierung der Diagnostik, Entwicklung immunprophylaktischer Maßnahmen und die Ausarbeitung von Bekämpfungsstrategien. Bei der Aufklärung von Erreger-Wirtstier-Beziehungen, d. h. dem

Infektions- und Krankheitsablauf im Tier, setzt das Institut virologische, bakteriologische, mykologische, molekularbiologische und immunologische Methoden ein. Nach tierexperimentellen Studien kommen zudem pathomorphologische und molekularbiologische Methoden in Verbindung mit der elektronenmikroskopischen Analyse von Ultrastrukturen zum Einsatz. Arbeitsschwerpunkte bilden die Diagnostik und Bekämpfung von virusbedingten Fischkrankheiten, die Immunologie von Nutzfischen sowie Entomologie und Faktorenkrankheiten. Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen bilden entomologische Untersuchungen zur Kompetenz verschiedener Arthropoden, Virusinfektion zu übertragen, sowie die Diagnostik, Pathogenese, Immunantwort und molekulare Epidemiologie von Virusinfektionen bei Nutzfischen.

In Zusammenarbeit mit anderen Instituten des FLI führt das IMED Studien zur molekularen Diagnostik und Pathogenese der Klassischen Geflügelpest durch. Multifaktoriell bedingte Infektionskrankheiten (Faktorenkrankheiten) werden beim Schwein sowie bei Nutzfischen untersucht. Das IMED führt die Nationalen Referenzlaboratorien für anzeigepflichtige Fischseuchen (Virale Hämorrhagische Septikämie, Infektiöse Hämato-poetische Nekrose, Infektiöse Anämie der Lachse, Koi-Herpesvirus (KHV)-Infektion der Karpfen sowie die für das Gebiet der EU exotischen Krankheiten Epizootische Hämato-poetische Nekrose und Epizootisches Ulzeratives Syndrom), für anzeigepflichtige Tierseuchen bei Weichtieren (Bonamiose, Marteiliose sowie die für die EU exotischen Infektionen mit den Parasiten *Bonamia exitiosa*, *Perkinsus marinus* und *Mikrocytos mackini*), für anzeigepflichtige Tierseuchen bei Krebsen (Weißpünktchenkrankheit/White Spot Disease und die exotischen Krankheiten Taura-Syndrom, Gelbkopfkrankheit/Yellowhead Disease). Darüber hinaus sind im Institut das OIE- und nationale Referenzlabor für Enzootische Bovine Leukose sowie die nationalen Referenzlabore für Caprine Arthritis/Enzephalitis und Maedi/Visna beim Schaf angesiedelt. Das nationale Referenzlabor für Bienenseuchen (Amerikanische Faulbrut, Kleiner Beutenkäfer, Tropilaelaps-Milbe) wurde im IMED neu etabliert. Im Zusammenhang mit den hoheitlichen Tätigkeiten der Referenzlaboratorien werden vielfältige Beratungstätigkeiten hinsichtlich der Bekämpfung und Diagnostik von Infektionskrankheiten der Tiere bei nationalen und internationalen Behörden und Verbänden durchgeführt.

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. Dr. T. W. Vahlenkamp (bis 30.09.2010)

Wiss. Direktor Dr. D. Fichtner (kommissarischer stellvertretender Institutsleiter)

Vertretung: Direktor und Professor Prof. Dr. J. P. Teifke (bis 15.02.2010)

Wiss. Direktor Dr. D. Fichtner (kommissarischer stellvertretender Institutsleiter bis 30.09.2010)

Wiss. Oberrat Dr. U. Fischer (Vertreter bei Abwesenheit des amtierenden Institutsleiters)

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Oberrat Dr. S.M. Bergmann, Dr. U. Blohm, Wiss. Oberrat Dr. D. Fichtner, Wiss. Oberrat Dr. U. Fischer, Wiss. Direktor Dr. H. Granzow, PD Dr. H. Kampen, Dr. B. Köllner, G. Kotterba, Wiss. Oberrätin Dr. E. Lange, M. Lenk, C. Maresch, Dr. M. Schäfer, Wiss. Oberrätin Dr. H. Schütze

Drittmittelbeschäftigte:

Dr. F. Takizawa, P. Kotterba, A. Breithaupt, T. Korytář, M. Gac, D. Deckers, V. Soto-Lampe, D. Thi Huong, J. Jaros

INSTITUT FÜR NEUE UND NEUARTIGE TIERSEUCHENERREGER (INNT)

Das **Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger** entwickelt neue Nachweismethoden für Prion-Erreger (BSE, Scrapie) und zur Differenzierung von Prion-Stämmen. Das INNT führt experimentelle BSE-Pathogenesestudien mit Rindern und kleinen Wiederkäuern durch und führt eine nationale BSE-Probenbank. Das INNT entwickelte transgene Mausmodelle zur Analyse der Übertragbarkeit dieser Erreger über Speziesgrenzen hinweg sowie zur Bedeutung der Glykosylierung des Prion-Proteins. Die bei der Prion-Umfaltung beteiligten Bereiche des Prion-Proteins werden in Scrapie-infizierten Zellkulturen und zellfreien Systemen untersucht. Neben diesen neuartigen Tierseuchenerregern bearbeitet das INNT schwerpunktmäßig virale Zoonosen, die durch Flaviviren (West-Nile-Fieber-, Japanische-Enzephalitis-Viren u. a.), Alphaviren (Amerikanische Pferdeenzephalomyelitis-Viren), Bunyaviren (Hanta-, Rift-Valley-Fieber-, Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Viren u. a.), Hepeviren (Hepatitis-E-Viren), Filoviren (Marburg-, Ebola-Viren) und durch Henipaviren (Hendra-, Nipah-Viren) verursacht werden. Laborarbeiten zu letzteren Erregern erfordern teilweise höhere Sicherheitsstufen (BSL3, BSL4), die derzeit am FLI noch nicht oder nur eingeschränkt zur Verfügung stehen. Daher konzentrieren sich die Forschungsarbeiten derzeit vorrangig auf die Etablierung diagnostischer Nachweisverfahren (quantitative real-time RT-PCR, Microarray-Technologie sowie serologische und antigenetische Nachweistech-niken). Im INNT werden die Aufgaben der Nationalen Referenzlaboratorien für BSE, Scrapie, viral-bedingte Pferdeenzephalomyeliden, West-Nile-Viren, Japanische Enzephalitis-Viren, virale Pferdeenzephalomyeliden (Alphaviren), Bunyaviren (hier: Hantaviren), Rift-Valley-Fieber-Viren, Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Viren, Filoviren und Henipaviren wahrgenommen. Im Rahmen des Neubaus wird das INNT für den Betrieb des BSL4-Bereiches verantwortlich sein. Darüber hinaus ist am INNT die veterinärmedizinische Ge-

schäftsstelle der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen angesiedelt. Ziel dieser Plattform ist es, die Forschungsaktivitäten im Zoonosenbereich zu forcieren sowie eine breite horizontale Vernetzung von Human- und Veterinärmedizin zu fördern. Dazu dient vor allem der Aufbau des Datenbankinternetportals, die Durchführung des jährlichen Symposiums für Zoonosenforschung sowie das zentrale Informations- und Kommunikationsportal unter www.zoonosen.net.

Daneben betreibt das INNT das Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“ sowie eine Technologie-Plattform zur Erstellung transgener Mäuse mit zugehöriger SPF-Haltung.

Leitung: Direktor und Professor Prof. Dr. M. H. Groschup

Vertretung: Direktor und Professor Dr. A. Balkema-Buschmann

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dr. M. Eiden, Dr. Ch. Fast, Dr. M. Keller, PD Dr. R. Ulrich, Dr. U. Ziegler,

Drittmittelbeschäftigte:

Dr. S. Fereidouni, Dr. M. Mertens, Dr. A. Wiethölter

Doktoranden:

L. Kwasnitschka, G. Priemer, J. Schlosser, P. Dremsek, H. Sheikh Ali, J. Angenvoort, S. Jäckel, K. Tauscher, S. Schmidt, M. Franz, S. Freyse, E. Ortega Soto, U. Rosenfeld, M. Schlegel, K. Schmidt, B. Strohmeier, W. Wohlfromm, A. Vina-Rodriguez

INSTITUT FÜR TIERERNÄHRUNG (ITE)

Das **Institut für Tierernährung** forscht auf den Gebieten Ernährungsphysiologie, Futtermittelkunde und Tierfütterung. Im Mittelpunkt der Arbeiten stehen tiergesundheitliche Aspekte als Voraussetzung für eine effektive Umwandlung von Futterinhaltsstoffen in qualitativ hochwertige Lebensmittel tierischer Herkunft oder andere Leistungen von Tieren bei einer möglichst geringen Umweltbelastung. Dem Einfluss verschiedener essenzieller und unerwünschter Nahrungsbestandteile auf das Immunsystem kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. So wird die Relevanz einiger Vitamine sowie Spurenelemente als Vertreter der essenziellen Nahrungsbestandteile auf das Immunsystem verschiedener Tierarten untersucht. Von den unerwünschten Nahrungsbestandteilen sind insbesondere bestimmte Mykotoxine mit immunmodulierender Wirkung von Interesse, da sie in Futtermitteln in höheren Konzentrationen vorkommen können. Hierzu führt das Institut für Tierernährung bei Wiederkäuern, Schweinen und Geflügel Untersuchungen durch, um die Wirkmechanismen aufzuklären, Möglichkeiten der De-

kontamination von belasteten Getreidepartien aufzuzeigen und kritische Konzentrationen im Futter abzuschätzen. Hinzu kommt die Analytik der Toxine sowie deren Metaboliten in Lebensmitteln tierischen Ursprungs („carry over“).

Im Bereich Stoffwechsel und Nährstoffbedarf werden die Umsetzungen im Verdauungstrakt der Nutztiere untersucht; besonders das Vormagensystem der Wiederkäuer ist hierbei im Fokus, da Nährstoffumsetzungen in diesem Bereich entscheidenden Einfluss auf umweltrelevante Ausscheidungen, wie Methan und Stickstoff, ausüben.

Weitere Themen sind die Regulation der Futter- und Wasseraufnahme, die artgerechte Ernährung von Nutztieren sowie Ableitungen zum Energie- und Nährstoffbedarf verschiedener Tierarten. Das Institut untersucht und bewertet außerdem die Wirkungsweise und die Effizienz neuartiger Futterzusatzstoffe.

Leitung: Direktor und Professor Prof. Dr. Dr. S. Dänicke

Vertretung: Wiss. Oberrat Dr. U. Meyer

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dr. A. Berk, Dr. S. Döll, Wiss. Oberrätin PD Dr. I. Halle, Dr. A. Hönscheid, Dr. L. Hüther, Dr. P. Lebzien, Wiss. Oberrätin Dr. H. Valenta

Drittmittelbeschäftigte:

M. Aschemann, B. Brosig, M. Lohölter, J. Pappritz, I. Rempe, L. Renner, D. v. Soosten, K. Wilkerling

INSTITUT FÜR TIERSCHUTZ UND TIERHALTUNG (ITT)

Das **Institut für Tierschutz und Tierhaltung** führt grundlagen- und anwendungsorientierte Forschungsprojekte zur Bewertung und Weiterentwicklung tiergerechter Haltungssysteme sowie zu Transport, Betäubung und Tötung landwirtschaftlicher Nutztiere durch. Die Forschungen basieren auf der Erkenntnis, dass sich die aktuelle Anpassungsfähigkeit von Individuen an ihre Haltung aus der stammesgeschichtlichen Anpassung an den jeweiligen Lebensraum ableitet. Unterschiede in der Anpassungsfähigkeit werden dabei durch die genetische Variabilität und individuelle Erfahrungen verursacht. In die Forschung werden zudem ökonomische Aspekte, Managementaspekte wie die Bestandshygiene sowie durch die Tierhaltung verursachte Umweltbelastungen einbezogen, um Konflikte zwischen Ökonomie, Tier- und Umweltschutz zu vermeiden. Tierschutzrelevante Probleme in der Haltung sind nur zu verstehen, wenn die Mechanismen, durch die die Anpassungsreaktionen der Tiere vermittelt werden, bekannt sind. Hierbei bilden motivationale und kognitive, stressphysiologische und immunologische sowie molekulare Steuerungsmechanismen des Verhaltens einen Schwerpunkt. Als Faktoren, die

die Anpassungsreaktionen der Tiere an die Haltungsbedingungen festlegen oder modifizieren, werden insbesondere Reifungsprozesse, genetische Faktoren, Ernährung und Gesundheitsstatus der Tiere berücksichtigt. Ausgehend von den Anpassungsmechanismen lassen sich Indikatoren für eine objektive Erfassung der Auswirkungen von Haltungssystemen ableiten. Für die praxistaugliche Umsetzung sind hierbei Indikatoren wichtig, die sich experimentell wiederholen und validieren lassen. Dazu gehören Verhaltensänderungen und -störungen, Stressreaktionen, Störungen des Immunsystems und veränderte Genaktivitäten, pathologische Merkmale sowie Morbidität und Mortalität. Weiterhin sollten Bewertungsverfahren möglichst wenig Aufwand erfordern und wenig störanfällig sein. Bewertungsindikatoren und -verfahren bilden auch die Werkzeuge, um Verbesserungen in der tiergerechten Haltung von Nutztieren zu entwickeln und zu prüfen. In enger Zusammenarbeit mit der Praxis werden hierbei potentiell problematische Haltungsfaktoren identifiziert und untersucht. Daraus resultieren Maßnahmen, die negative Auswirkungen der Haltung reduzieren oder vermeiden, z. B. durch veränderte Haltungseinrichtungen, Fütterung, Tier-Mensch-Interaktionen sowie verbesserte Transportbedingungen, Betäubungs- sowie Schlachtverfahren.

Leitung: Direktor und Professor Dr. L. Schrader

Vertretung: Dr. M. Marahrens

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Rätin Dr. J. Berk, Dr. B. Bünger, Dr. S. Dippel, Dr. J. Kjaer, Dr. N. Kleinschmidt, Wiss. Oberrat C. Otto, Wiss. Oberrat Dr. L. Phi van, Dr. S. Petow, Dr. F.-D. Zerbe

Drittmittelbeschäftigte:

C. Brendler, U. Feise, J. Kirchner, Dr. B. Scholz, A. Schubbert, J. Schulz, K. Steinkamp, T. Pickel

INSTITUT FÜR BAKTERIELLE INFEKTIONEN UND ZOONOSEN (IBIZ)

Das **Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen** forscht zur Ätiologie, Pathogenese und Epidemiologie von vorwiegend bakteriell bedingten Infektionskrankheiten von Nutz-, Heim- und Wildtieren. Ein bedeutender Teil der Arbeiten ist auf Krankheiten und Krankheitserreger ausgerichtet, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden können (Zoonosen). Die Ergebnisse dieser Arbeiten fließen in die Entwicklung und Optimierung diagnostischer Verfahren sowie die Erarbeitung von Bekämpfungsstrategien ein. Im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten stehen durch Salmonellen, Campylobacter, Brucellen, Clostridien, Francisellen und Burkholderien bedingte Infektionen. Unabhängig

vom jeweiligen Erreger werden schwerpunktmäßig Untersuchungen zur Erregerprävalenz durchgeführt, Übertragungswege und -mechanismen charakterisiert, Fragen der Erregerpersistenz bearbeitet, Infektionsketten und epidemiologische Zusammenhänge mit Hilfe klassischer und molekularer Methoden aufgedeckt, die zoonotische Bedeutung bestimmter Erreger ermittelt, Infektionsmodelle etabliert und therapeutische Möglichkeiten im Tiermodell geprüft. Das IBIZ führt die Nationalen Referenzlaboratorien für Brucellose, Campylobacteriose, Tularämie, kontagiöse equine Metritis, Milzbrand, Rauschbrand, Vibrionenseuche der Rinder, Rotz, Salmonellose der Rinder und durch Zecken übertragene Krankheiten. Die Laboratorien für Brucellose und Rotz sind zudem als Referenzlabore der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) anerkannt.

Leitung: Direktor und Professor Prof. Dr. Heinrich Neubauer

Vertretung: Direktor und Professor PD Dr. H. Tomaso

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Dir. Dr. M. Elschner, Dr. I. Hänel, Wiss. Oberrat Dr. H. Hotzel, Dr. C. Klaus, Dr. F. Melzer, Dr. U. Methner, Dr. W. Müller, Dr. P. Otto, Dr. A. Raßbach, Dr. C. Seyboldt, Dr. L. Sprague, Dir. u. Prof. PD Dr. J. Süss

Drittmittelbeschäftigte:

Dr. S. Braun, Dr. M. Dietzsch, J. Diabola, Dr. M. Lange, Dr. B. Pauly, Dr. E. Preuß, Dr. G. Schmoock, Dr. C. Schnee, A. Schneeberg

INSTITUT FÜR MOLEKULARE PATHOGENESE (IMP)

Das Institut für molekulare Pathogenese (IMP) hat die Aufgabe, die Interaktion zwischen bakteriellen Erregern von Tierseuchen und Zoonosen und ihren Wirten auf molekularer Ebene zu charakterisieren, die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich ihrer Relevanz im Gesamtorganismus zu evaluieren und daraus Verfahren zur Prophylaxe und Bekämpfung von Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren zu entwickeln. Wissenschaftliche Schwerpunkte sind die Aufklärung der Systematik der Chlamydien und die Entwicklung von Strategien zur Bekämpfung von Chlamydiosen bei Tier und Mensch sowie die molekulare Epidemiologie und die Diagnostik von Mykobakterien-Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren (Rindertuberkulose und Paratuberkulose). Methodische Schwerpunkte sind die Entwicklung innovativer, Microarray-basierter Methoden zur schnellen Diagnostik und Differenzierung der Erreger. Für Untersuchungen zur Funktion der molekularen Strukturen auf Erregerseite und ihrer Gegenspieler auf Wirtsseite werden bevorzugt *In-vitro*-Modelle mit primären Zellkulturen der Zieltierspezies (Rind, kleine Wiederkäuer, Schwein und

Geflügel) verwendet. Der Einfluss bakterieller Faktoren auf die komplexen Interaktionen des Gesamtorganismus wird in homologen tierexperimentellen Systemen überprüft. Das IMP führt die Nationalen Referenzlaboratorien für Tuberkulose beim Rind, Paratuberkulose, Psittakose, Lungenseuche des Rindes sowie Beschälseuche. Das Labor für Psittakose ist zudem als Referenzstelle der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) anerkannt.

Leitung: Prof. Dr. C. Menge

Vertretung: Dr. K. Sachse

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

PD Dr. A. Berndt, Dr. E. Borrmann, Dr. M. Heller, Dr. H. Köhler, Prof. Dr. E. Liebler-Tenorio, K. Kerner, PD Dr. I. Moser, Dr. P. Möbius, PD Dr. P. Reinhold PhD, Dr. K. Sachse, Dr. E. Schubert

Drittmittelbeschäftigte:

F. Aschenbrenner, M. Braukmann, I. Fritsch, U. Heise; J. Lambertz, H. Lenzko, M. Meyer, K. Möhle, C. Ostermann, Dr. A. Rüttger, C. Schönfeld, A. Soschinka, A. Vogel, S. Wilsky

INSTITUT FÜR NUTZTIERGE NETIK (ING)

Wissenschaftliche Fragen der Genetik und Gentechnologie und der genetischen Vielfalt bei landwirtschaftlichen Nutztieren stehen im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten des **Instituts für Nutztiergenetik**. Schwerpunkte bilden Untersuchungen zur Charakterisierung und Erhaltung genetischer Ressourcen, biotechnische Methoden zu deren Erhaltung sowie die Entwicklung informationstechnologischer Strategien, mit denen der Erhalt genetischer Ressourcen auf regionaler und globaler Ebene ermöglicht werden kann. Die Charakterisierung genetischer Ressourcen schließt die Ermittlung individueller phänotypischer Varianz, z. B. bei Wachstum und Fortpflanzung, ein und ermöglicht dadurch die Analyse der Leistungsgrenzen bei Nutztieren. Ein weiterer Schwerpunkt der wissenschaftlichen Arbeiten sind moderne reproduktionsbiologische Verfahren, wie *In-vitro*-Produktion von Embryonen, Spermientrennung, somatisches Klonen und die Stammzelltechnologie, die sowohl für den Erhalt genetischer Ressourcen als auch für zukunftsweisende Zuchtprogramme von großer Bedeutung sind. Neue molekulargenetische Erkenntnisse in Kombination mit reproduktionsbiologischen Verfahren erlauben die Zucht transgener Tiere für unterschiedliche Anwendungsperspektiven, wodurch die genetische Vielfalt erweitert werden kann. Hierzu gehört auch die Entwicklung neuer biomedizinischer Anwendungsmodelle, mit einem Schwerpunkt bei der Xenotransplantation. Ferner werden Arbeiten zu den Themenbereichen molekulare Mikrobiologie und An-

tibiotikaresistenz durchgeführt, die im Zusammenhang mit der Diagnostik und Bekämpfung bakterieller Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren wichtig sind. Typisch für die aktuelle Forschung ist die Einbindung in nationale und internationale Forschungsverbünde. Hervorzuheben ist die Beteiligung am Exzellenz-Cluster „REBIRTH“, das an der Medizinischen Hochschule Hannover angesiedelt ist.

Leitung: Direktor und Professor Prof. Dr. H. Niemann

Vertretung: Dir. u. Prof. Dr. Dr. h. c. mult. E. Groeneveld

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Oberrat Dr. U. Baulain, Dr. Ch. Ehling, Dir. u. Prof. Dr. R. Großmann, Wiss. Oberrat Dr. M. Henning, Wiss. Oberrat Dr. S. Klein, Wiss. Rat Dr. P. Köhler, Dr. W. Kues, Wiss. Oberrätin Dr. A. Lucas-Hahn, Dir. u. Prof. Prof. Dr. N. Parvizi, Wiss. Direktor Prof. Dr. D. Rath, Wiss. Direktor Prof. Dr. S. Schwarz, Wiss. Oberrat Dr. S. Weigend

Drittmittelbeschäftigte:

H. Ahrens, N. Bodzsar, Ph.D G. Brenner Michael, Dr. A. Cunha, Dr. Z. Ducheve, A. Feßler, K. Fricke, Dr. W. Garrels, J. Hauschild, Dr. J. Heinzmann, Dr. U. Janssen-Tapken, Dr. K. Kadlec, Prof. Dr. J. Laurincik, Dr. M. Nowak-Imialek, Dr. S. Petkov, Dr. B. Petersen, V.C.C. Truong

INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE (IFI)

Das **Institut für Immunologie** erforscht die immunologischen Mechanismen von virusbedingten Tierseuchen sowie Prionenerkrankungen. Untersuchungen an verschiedenen Viren tragen zur Verbesserung und Entwicklung neuer Bekämpfungs- und Kontrollstrategien sowie für die Risikoabschätzung bei der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen bei. Das bearbeitete Erregerspektrum reicht von Pestiviren (Virus der klassischen Schweinepest; Virus der bovinen Virusdiarrhoe) über Caliciviren (Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche) und Herpesviren (Pseudorabiesvirus) bis zu Parapockenviren. Erforscht werden die biochemischen Grundlagen der Virusvermehrung und die molekularen Mechanismen der Interaktion von Virus und Immunsystem. Insbesondere aus den Arbeiten zur Attenuierung von Pestiviren sowie den Untersuchungen zum Einsatz des Parapockenvirus als Vektor aufgrund seiner immunstimulierenden Eigenschaften ergeben sich neue Aspekte für die Impfstoffentwicklung. Das IfI beschäftigt sich außerdem mit der Aufklärung der zellulären und humoralen Immunantwort nach Virusinfektionen. Insbesondere Wechselwirkungen des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit Influenzaviren werden untersucht, wobei Patho-

genese und Interventionsmöglichkeiten an experimentellen Modellen im Mittelpunkt stehen.

Auf zellbiologischer Ebene liegen die Schwerpunkte auf den für eine effiziente Immunantwort relevanten Signalwegen und den Mechanismen der Antigenprozessierung zur MHC-vermittelten Präsentation der viralen Antigene. Arbeiten zur Interaktion zwischen Viren und Immunzellen sollen immunpathologische Vorgänge auf B- und T-Zellebene aufklären. Auf immunologischer und zellbiologischer Ebene werden sowohl pathologische Mechanismen der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien weiter abgeklärt als auch Wege einer möglichen Intervention aufgezeigt.

Leitung: Direktor und Professor Prof. Dr. L. Stitz

Vertretung: Direktor und Professor Prof. Dr. E. Pfaff

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

PD Dr. R. Kammerer, PD Dr. M. Knittler, Wiss. Dir. Prof. Dr. G. Meyers, Dr. B. Petsch, Wiss. Oberrat Prof. Dr. O. Planz, Wiss. Dir. Dr. H.-J. Rziha.

Drittmittelbeschäftigte:

D. Aberle, R. Amann, I. Bintintan, S. Burrack, K. Dröbner, D. Fiegl, E. Haasbach, M. Haß, Dr. C. Luttermann, J. Rohde, D. Rosenkranz, Dr. E.-M. Schürmann, A. Vogel, R. Wennesz, S. Wirtz

INSTITUT FÜR EPIDEMIOLOGIE (IFE)

Das **Institut für Epidemiologie** beschäftigt sich mit der Epidemiologie einheimischer Tierseuchen wie Aviäre Influenza, Blauzungenkrankheit oder Klassische Schweinepest, der Prävention nicht einheimischer Infektionskrankheiten und den biomathematischen sowie epidemiologischen Grundlagen der Risikobewertung. Mit modernen epidemiologischen Methoden, die auch auf mathematische Modelle und geographische Informationssysteme zurückgreifen, werden neue Erkenntnisse gewonnen, die in die praktische Tierseuchenbekämpfung einfließen. Darüber hinaus nimmt das Institut behördliche Aufgaben wahr, insbesondere im Zusammenhang mit dem Tierseuchennachrichtensystem (TSN) und dem Trade Control and Export System (TRACES) der Europäischen Union, und beteiligt sich an der Entwicklung elektronischer Werkzeuge des Krisenmanagements im Falle von Tierseuchenausbrüchen. Die Evaluierung von Diagnoseverfahren für epidemiologische Zwecke sowie die Übernahme von Referenzfunktionen auf nationalem und internationalem Niveau tragen dazu bei, die Qualität der Datengrundlage für epidemiologische Studien zu sichern. Zu den Forschungsschwerpunkten gehören Tierkrankheiten mit wirtschaftlicher und/oder zoonotischer Bedeutung, beispielsweise Tollwut, Q-Fieber, Chlamydiose, Salmonellose,

Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli*, Toxoplasmose, Neosporose und Echinokokkose. Die Reservoirefunktion verschiedener Tierpopulationen für Tierseuchenerreger und wirtschaftlich bedeutsame Erkrankungen von Haustieren wird ebenfalls untersucht.

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. F.J. Conraths

Vertreter: Direktor und Professor Dr. M. Kramer

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Oberrat PD Dr. A. Aschfalk (derzeit beurlaubt), Dr. A. Fröhlich, Dr. J. M. Gethmann, Wiss. Oberrat Dr. L. Geue, Wiss. Oberrat Dr. K. Henning, Dr. D. Höreth-Böntgen, A. Micklich, Wiss. Dir. Dr. T. Müller, Dr. C. Probst, Wiss. Oberrat Dr. G. Schares, S. Schwarz, Wiss. Oberrat Prof. Dr. T. Selhorst, Wiss. Oberrat Dr. C. Staubach, Dr. A. Sutor, Dr. F. Unger (beurlaubt)

Drittmittelbeschäftigte:

Dr. C. M. Freuling, D. Herrmann, A. Hilbert, M. Kasper, M. Konschake, H. Lentz, P. Maksimov, A. Mathey, Dr. C. Schoene, J. Sonnenburg, A. Wolf

ABTEILUNG FÜR EXPERIMENTELLE TIERHALTUNG UND BIOSICHERHEIT (ATB)

Die **Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit** ist eine gemeinschaftliche Einrichtung des Friedrich-Loeffler-Institutes. In ihr wird die gesamte experimentelle Tierhaltung am Hauptstandort Insel Riems organisiert und koordiniert. Dazu zählen auch die Laboratorien für Pathologie und Bakteriologie. Neben der Zulassungsstelle sind der ATB weiterhin die zentralen Einrichtungen zur Bereitstellung von biologischem Versuchsmaterial, d. h. die Zellbank und die Virusbank des FLI zugeordnet.

Der Leiter der ATB ist zugleich mit der Wahrnehmung der Funktion des Amtstierarztes für den Standort Insel Riems innerhalb des FLI betraut und leitet als „Biorisk Officer“ das Biosicherheitsmanagement des FLI.

Basierend auf dem CEN Workshop Agreement (CWA) 15793:2008 „Laboratory Biorisk Management Standard“ wurde 2010 am FLI begonnen, die in diesem Leitfaden benannten Anforderungen am FLI neu zu organisieren und gemäß eines „Plan-Do-Check-Act“-Zyklus proaktiv und systematisch umzusetzen. Die Anforderungen sind zudem weitgehend durch die europäischen und nationalen Rechtsgrundlagen hinsichtlich der biologischen Sicherheit (biosafety) und des Anlagen- und Objektschutzes mit Blick auf biologische Gefahrenlagen (biosecurity) abgedeckt. Durch die Implementierung solcher Qualitätsmanagementstrukturen soll eine noch höhere Effizienz bei der Vermeidung von Risiken, die mit der Handhabung, Lagerung und Entsor-

gung von infektiösen biologischen Materialien verbunden sind, erreicht werden.

Die Struktur des CWA wurde einem „Biosicherheitshandbuch“ zu Grunde gelegt, welches die rechtlich relevanten Anforderungen im Zusammenhang mit Biologischer Sicherheit abbildet.

Leitung: Direktor und Professor Prof. Dr. J. P. Teifke

Vertretung: Präsident und Professor Prof. Dr. Dr. h.c. Th. C. Mettenleiter

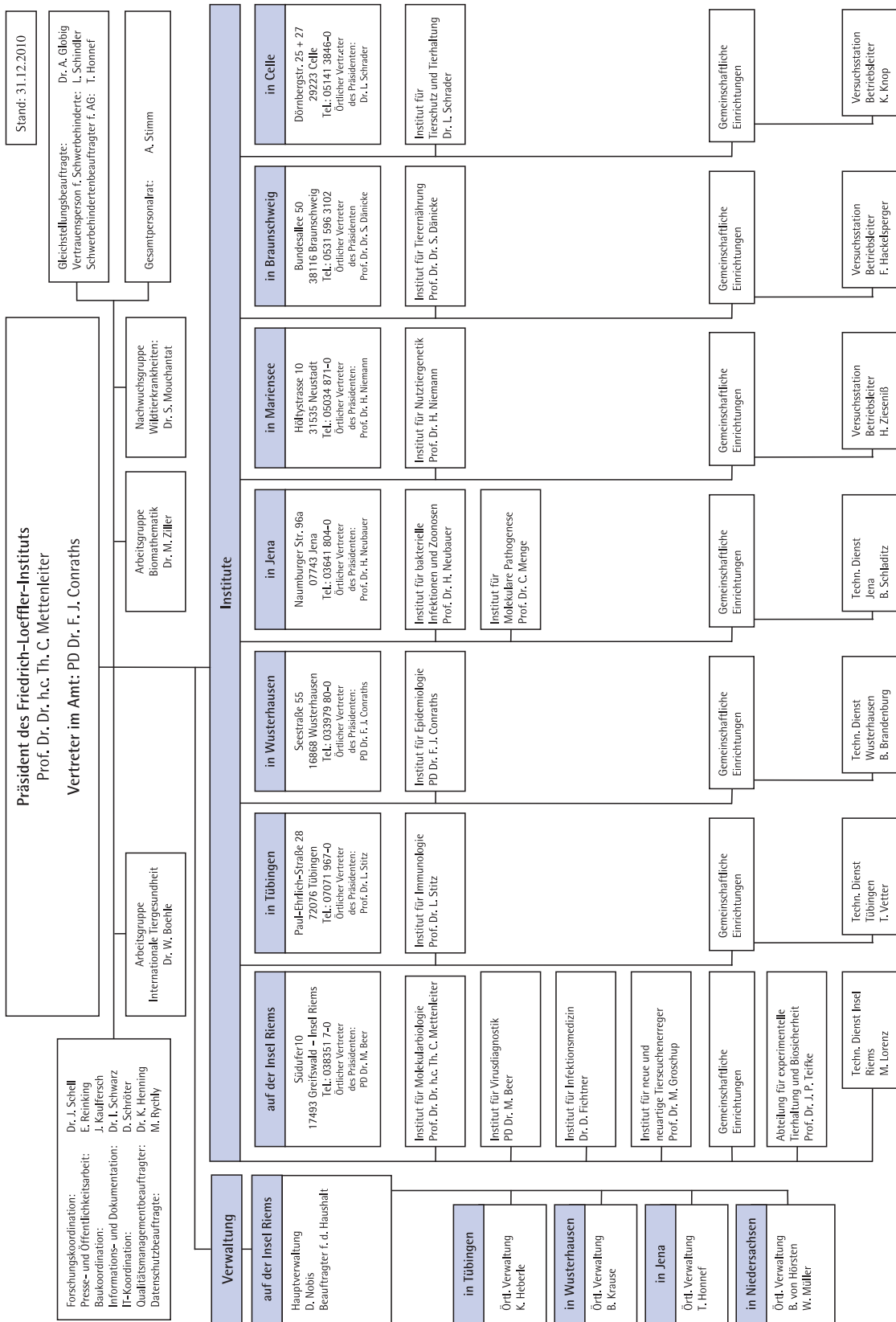
Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Oberrätin Dr. E. Lange, Wiss. Oberrat Dr. M. Dauber,
Wiss. Oberrätin Dr. J. Heidrich, S. Freyse, M. Lenk

Drittmittelbeschäftigte:

A. Breithaupt, M. Skiba

ORGANIGRAMM STAND 31.12.2010



BESCHÄFTIGTE

ÜBERSICHT ÜBER VORHANDENE PERSONALSTELLEN AM FLI – STAND 31.12.2009

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler			Nichtwissenschaftler (ohne Verwaltung)			Verwaltungs- personal			Gesamt
	a	b	ges.	a	b	ges.	a	b	ges.	
BRAUNSCHWEIG										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für Tierernährung	10	3	13	19,3	3,9	23,1				36,1
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Versuchstierhaltung				9,6	3	12,6				12,6
b) Informationstechnik				0,5		0,5				0,5
4. Örtliche Verwaltung							2,5		2,5	2,5
CELLE										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für Tierhaltung und Tierschutz	9,6	5,5	15,1	17,9	6	23,9				39
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Informationszentrum				0,5		0,5				0,5
4. Betriebstechnischer Dienst				3		3				3
5. Örtliche Verwaltung				1,5		1,5	5,8		5,8	7,3
INSEL RIEMS										
1. Leitung u. zentrale Dienste	8	4,5	12,5	1		1	1		1	14,5
2. Institut f. Molekularbiologie	9	10	19	11	2	13				32
3. Institut f. Virusdiagnostik	13	7,5	20,5	15	8,7	23,7	1		1	45,2
4. Institut f. Infektionsmedizin	10	4	14	11,6	2	13,6	1		1	28,6
5. Institut für neue und neu- artige Tierseuchenerreger	7	8,5	15,5	7	3	10	1		1	26,5
6. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Abteilung experimentelle Tier- haltung und Biosicherheit ATB	6	0,5	6,5	32,5	6	38,5				45
b) Informationszentrum und Dokumentation	1		1	2	1	3				4
c) Informationstechnik	1		1	4	3	7				8
d) Nährmedien				1		1				1
e) Fotolabor				2		2				2
7. Betriebstechnischer Dienst	1		1	34,2	2	36,2	1		1	38,2
8. Hauptverwaltung	3,5		3,5	14	4	18	31,8	8,9	40,7	62,2
JENA										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen	14	3	17	19,7	2,3	22				39
3. Institut für molekulare Pathogenese	12	7,5	19,5	18,4	5	23,4				42,9
4. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Informationstechnik	1		1	2		2				3
b) Information u. Dokumentation				1		1				1
c) Versuchstierhaltung				8	2	10				10
d) Zentrallager/Nährmedien				3		3				3
5. Betriebstechnischer Dienst				7		7				7
6. Örtliche Verwaltung				6		6	5,7		5,7	11,7

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler			Nichtwissenschaftler (ohne Verwaltung)			Verwaltungs- personal			Gesamt
	a	b	ges.	a	b	ges.	a	b	ges.	
MARIENSEE										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für Nutztiergenetik	14	13	27	62,3	4,9	67,2				94,2
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Informationszentrum				5		5				5
b) Information u. Dokumentation				0,8		0,8				0,8
c) Fotolabor				1		1				1
4. Betriebstechnischer Dienst				7		7				7
5. Örtliche Verwaltung				7,2		7,2	7,1		7,1	14,3
TÜBINGEN										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für Immunologie	7	7	14	12,5	5	17,5				31,5
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Informationstechnik				2		2				2
c) Versuchstierhaltung				4	1	5				5
d) Zentrallager/Nährmedien				1		1				1
4. Betriebstechnischer Dienst				11	1	12				12
5. Örtliche Verwaltung				5	1	6	6,4		6,4	12,4
WUSTERHAUSEN										
1. Sekretariat							2		2	2
2. Institut für Epidemiologie	13	7,5	20,5	17	9,3	26,3				46,8
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Information u. Dokumentation				1		1				1
b) Versuchstierhaltung				1	1	2				2
c) Nährmedien				1		1				1
4. Betriebstechnischer Dienst				5	1	6				6
5. Örtliche Verwaltung				4		4	3,9		3,9	7,9
Gesamt FLI	140,1	81,5	221,6	400,4	78	478,4	75,2	8,9	84,0	784,1

a) = aus Hausmitteln

b) = aus Zuwendung Dritter und von Bundesbehörden

III. AUSGEWÄHLTE SCHWERPUNKTTHEMEN

Institut für Molekularbiologie (IMB)

MORPHOGENESE UND INTRANEURONALE AUSBREITUNG NEUROTROPER VIREN

Alexandra S. Negatsch¹, Harald Granzow², Christina Maresch¹, Barbara G. Klupp¹, Walter Fuchs¹, Jens P. Teifke², Stefan Finke¹ und Thomas C. Mettenleiter¹

aus den Instituten für ¹Molekularbiologie und ²Infektionsmedizin des FLI

Neuroinvasive Viren führen zu oft lebensbedrohlichen Infektionen bei Mensch und Tier. Während die grundlegenden Replikationsprozesse vieler dieser Viren in nichtpolaren Kulturzellen meist gut untersucht sind, stellt die Analyse der Virusinfektion in hochpolarisierten Neuronen weiterhin eine Herausforderung dar. Wir kombinieren Lebendzell-Videomikroskopie (*live-cell video-imaging*) mit elektronenmikroskopischer Ultrastrukturanalyse, um vergleichend die molekularen Parameter für die Neuroinvasion von Vertretern zweier Virusfamilien, der Herpesviren und der Rhabdoviren, zu untersuchen und damit auch neue Möglichkeiten der Prävention und Therapie dieser Infektionen aufzuzeigen.

HERPESVIREN

In der Ordnung Herpesvirales umfasst die Familie Herpesviridae die drei Unterfamilien der *Alpha-*, *Beta-* und *Gammapherpesvirinae*. Während alle Herpesviren einige grundlegende biologische Merkmale wie die Virusmorphologie (Aufbau aus ikosaedrischem Nukleokapsid, Tegument und Hülle), den Replikationszyklus und die Fähigkeit zur Etablierung von Latenz gemeinsam haben, finden sich besonders beim Tropismus *in vivo* Unterschiede. Vertreter der *Alphaherpesvirinae* zeigen eine ausgeprägte Neuroinvasion und etablieren Latenz in Neuronen. Bekannte Vertreter sind unter anderem die humanpathogenen Herpes Simplex Viren Typ 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) sowie das Varicella-Zoster-Virus. Zu den wichtigen tierpathogenen Herpesviren gehören das Pseudorabiesvirus (Suid Herpesvirus 1, PrV), das Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) und die Equinen Herpesviren 1 und 4 (EHV-1 und EHV-4). In unseren Studien konzentrieren wir uns auf die Analyse des porcinen PrV und des humanen HSV-1.

Das dem Genus *Varicellovirus* zugehörige PrV besitzt ein sehr breites Wirtsspektrum, das neben dem natürlichen Wirt Schwein u. a. auch Wiederkäuer, Fleischfresser und Nager umfasst. Primaten weisen dagegen eine natürliche Resistenz auf. Das Virus ist Auslöser der Aujeszkyschen Krankheit, auch als „Pseudowut“ bezeichnet. Während adulte

Schweine nach Infektion zumeist nur milde respiratorische Symptome zeigen, verläuft bei allen anderen empfänglichen Tieren die Erkrankung häufig perakut bis akut unter schweren zentralnervösen Störungen. Häufig ist Juckreiz bis zur Automutilation zu beobachten. Hier hängt das Ausmaß der Neuroinvasion also vom Alter des Wirts bzw. von der Wirtsspezies ab, womit sich die Möglichkeit ergibt, sowohl limitierte als auch exzessive Neuroinvasion an einem nicht humanpathogenen Erreger zu untersuchen.

Auch das humanpathogene HSV-1 aus dem Genus *Simplexvirus* etabliert Latenz in Neuronen der Trigemininalganglien. HSV-1 ist weltweit verbreitet, wobei in Deutschland von einer Durchseuchung der Bevölkerung von 80–90 Prozent ausgegangen wird. Das klinische Bild ist vorwiegend mild. Weitverbreitet sind Manifestationen im Gesicht- und Lippenbereich mit typischer Bläschenbildung. Es können aber auch Keratitiden sowie lebensbedrohliche Enzephalitiden auftreten.

RHABDOVIREN

Die Familie *Rhabdoviridae* umfasst sechs Genera, von denen das Genus *Lyssavirus* neben durch Fledermäuse übertragene Erreger auch das Virus der klassischen Tollwut, das Rabies-Virus (RABV), enthält. RABV gehört zu den neurotrophen Erregern, die nach parenteraler Infektion in der Peripherie entlang von Neuronen zum Zentralnervensystem aufsteigen. Bei fehlender Post-Expositions-Prophylaxe führt die RABV Infektion im Regelfall zum Tode. RABV-Partikel besitzen eine für Rhabdoviren typische geschossförmige Morphologie. Im Inneren der Virionen befindet sich ein helikales Nukleokapsid, das aus der genomischen Einzelstrang RNA, dem Nukleoprotein N und den assoziierten Phospho- und Polymeraseproteinen besteht. Das Nukleokapsid wird über das Matrixprotein M mit der Hüllmembran verbunden, in die das virale Oberflächenprotein G eingelagert ist. Während der grundsätzliche Aufbau der Rhabdovirus-Partikel dem der Herpesviren (Nukleokapsid, Tegument = Matrix, Hülle) ähnelt, weisen Herpesvirus-Partikel gegenüber Rhabdovirionen eine deutlich höhere Komplexität auf. Dies spie-

gelt sich u. a. darin wieder, dass im Zuge der Herpesvirus-Morphogenese mehr als 30 verschiedene virale Proteine zu einem Virion zusammengefügt werden müssen, während bei Rhabdoviren fünf Virusproteine dazu ausreichen.

MORPHOGENESE VON RHABDO- UND HERPESVIREN IN PRIMÄREN NEURONEN

Obwohl die Bezeichnungen „Rabies“ und „Pseudorabies“ auf ähnliche klinische Erscheinungen hindeuten, sind Rhabdo- und Herpesviren in vielen biologischen Parametern grundsätzlich verschieden. Während Rhabdoviren ausschließlich im Zytoplasma infizierter Zellen replizieren, finden Zusammenbau und Reifung der Herpesviruspartikel im Zellkern und im Zytoplasma statt. Insbesondere im Hinblick auf die ausgeprägte Polarität von Neuronen stellt sich die Frage, inwieweit neuronenspezifische Funktionen, z. B. axonale Transportmaschinerien, die Replikation und Ausbreitung neurotroper Viren beeinflussen. Um die involvierten Mechanismen und deren Auswirkungen auf die unterschiedlichen Replikationsstrategien neurotroper Viren zu untersuchen, wurden primäre Neuronenkulturen etabliert, in denen Virusinfektionen unter Verwendung von Lebendzell-Videomikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie analysiert werden können.

NEURONENKULTIVIERUNG

Zur Anzucht der primären Neuronen wurden aus 15,5 Tagen alten Rattenembryonen nach mehreren Waschschrritten die paarig angelegten oberen Zervikalganglien entnommen und als Explantat auf mit Ornithin und Laminin beschichtete Objektträger überführt. Nachdem Axone aus den Neuronen des Explantats ausgewachsen waren (Abb.1), konnten diese Explantate nach einer Kultivierungszeit von 5 bis 7 Tagen für Infektionsversuche verwendet werden.

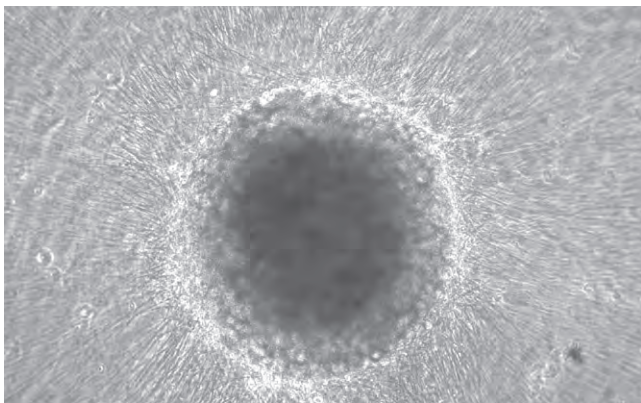


Abb. 1: Explantat von einem oberen Zervikalganglion (SCG) aus 15,5 Tage alten Rattenembryonen nach sechstägiger Kultivierung.

LEBENZZELL-VIDEOMIKROSKOPIE

Zur Untersuchung biologischer Prozesse in Echtzeit wird die Lebendzell-Videomikroskopie angewendet. Am IMB ist diese Technik auf der Basis konfokaler Laser-Scan Mikroskopie seit Jahren etabliert und kürzlich durch ein hochmodernes Gerät (Leica SP5 mit ultraschnellem Resonanzscanner) aufgewertet worden, was die Beobachtung auch schneller Transportprozesse in dreidimensionaler Auflösung ermöglicht. Um virale Strukturen in der infizierten Zelle identifizieren und verfolgen zu können, werden diese mit autofluoreszierenden Chromophoren versehen, z.B. dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Durch Fusion mit einem herpesviralen Kapsidprotein wird es in die reifenden Kapside eingebaut und erlaubt

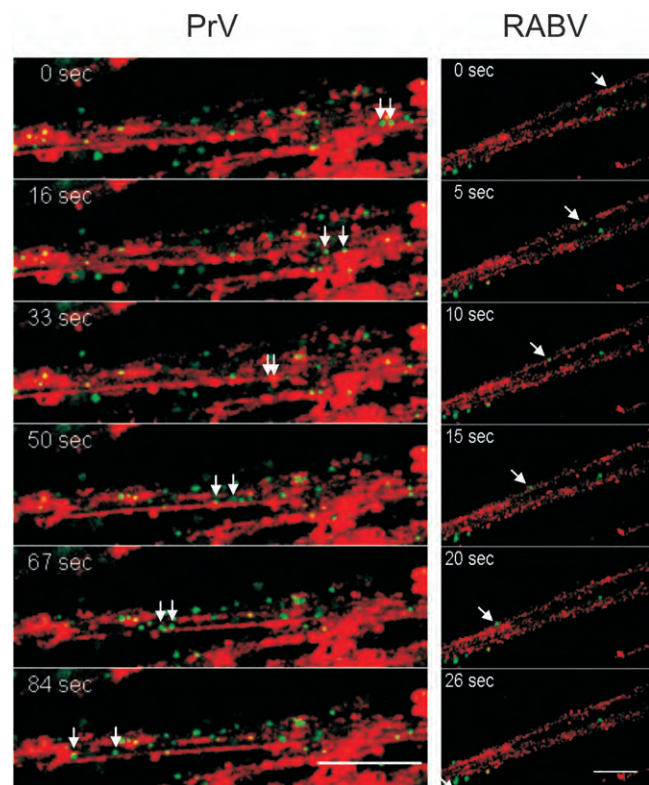


Abb. 2: Axonaler Transport von GFP-markierten PrV- und RABV-Partikeln. Primäre Neuronenkulturen wurden mit fluoreszenzmarkierten PrV und RABV infiziert. Nach 17 Stunden (PrV; links) und 20 Stunden (RABV; rechts) erfolgte die Beobachtung des axonalen Transports grün fluoreszierender Partikel mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie. Der gleichzeitige Nachweis zellulärer Membranen erfolgte mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff FM 4-64. Für beide Viren konnten individuelle Partikel beobachtet werden, die in den Axonen transportiert wurden (weiße Pfeile). Die schnelle (bis zu 276 msec / Bild) und hochauflösende Bildaufnahme erlaubt die lückenlose Verfolgung der Partikel, was eine quantitative Auswertung der Transportvorgänge ermöglicht. Während PrV-Partikel innerhalb von 84 Sekunden über eine Strecke von 42 µm transportiert wurden (entspricht 0,5 µm/sec), war der Transport von RABV mit 40 µm in 26 sec (entspricht 1,5 µm/sec) deutlich schneller. Balken: 10 µm.

deren fluoreszenzmikroskopische Darstellung in lebenden Zellen. Eine Markierung von Tollwutvirus-Partikeln ist durch Fusion des GFP an das virale Phosphoprotein möglich (Finke *et al.*, 2004). Repräsentative Bildsequenzen von virusinfizierten Rattenneuronen zeigen den gerichteten Transport von GFP-markierten Virusstrukturen innerhalb der Axone (Abb. 2). Während die PrV-Partikel eine Transportgeschwindigkeit von 0,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ aufwiesen, deuten für RABV gemessene Transportgeschwindigkeiten von 1,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ darauf hin, dass hierbei unterschiedliche zelluläre Transportprozesse beteiligt sein könnten.

INTRAAXONALER TRANSPORT VON ALPHAHERPESVIREN

Die molekularen Vorgänge bei der Herpesvirusreplikation und -ausbreitung sind in nicht differenzierten, nicht polaren permanenten Zellkulturen bereits detailliert untersucht worden (Mettenleiter *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu ist über die genauen Mechanismen der Virusreplikation in Neuronen *in vivo* und *in vitro* wenig bekannt. Im Fokus der Untersuchungen steht dabei der axonale Transport der Erreger. Während einzelne Replikationsstadien wie der Viruseintritt, die Nukleokapsidbildung im Kern, die Virusmorphogenese im Zellkörper und die Virusfreisetzung ähnlich wie in nicht polarisierten permanenten Zellkulturen verlaufen, zeigen sich beim axonalen Transport der Viren erhebliche Unterschiede. Es handelt sich hierbei um einen aktiven Transportprozess, der im infizierten Organismus über lange Strecken, teilweise mehrere Meter, entlang von Mikrotubuli verläuft und durch verschiedene zelluläre Motorproteine vermittelt wird. Beim retrograden Transport werden nach der Infektion die unbehüllten Viruspartikel mittels zellulärer Dynein-Motoren zum neuronalen Zellkörper transportiert, wo die produktive Virusreplikation oder die Etablierung einer Latenz erfolgt. Nach Reaktivierung, z. B. durch Stress, Einwirkung von UV-Licht oder Fieber, werden die Viruspartikel vom Ganglion entlang des Axons zu Epithelzellen in der Peripherie oder durch transsynaptische transneuronale Ausbreitung in das Zentralnervensystem transportiert. Dieser anterograde Transport wird durch den zellulären Motor Kinesin vermittelt und findet ebenfalls entlang der Mikrotubuli statt.

HINTERGRUND UND ZIELSTELLUNG DER UNTERSUCHUNG

Grundlegende Parameter des anterograden intraaxonalen Transports werden seit Jahren kontrovers diskutiert (Curanovic *et al.*, 2009, Diefenbach *et al.*, 2008). Zwei verschiedene Modelle wurden vorgeschlagen. Im „Subassembly-Modell“ werden subvirale Strukturen, d. h. virale Kapside getrennt von Vesikeln mit viralen Hüllproteinen transportiert, die erst an der Synapse (*in vivo*) bzw. im Wachstumskegel (*in vitro*)

oder entlang des Axons an als Varikositäten bezeichneten Verdickungen zu kompletten Virionen zusammengebaut werden. Dieses Modell wurde für HSV-1 favorisiert. Beim „Married-Modell“ werden komplette behüllte Virionen in Vesikeln entlang des Axons transportiert. Der Zusammenbau der Viruspartikel erfolgte zuvor im Zytosol des neuronalen Zellkörpers. Dieses Transportmodell wurde für PrV postuliert. Obwohl zu diesem Thema eine Reihe von Studien vorliegt, wurden vergleichende Analysen unter weitgehend identischen Untersuchungsparametern bisher nicht durchgeführt. In unserem Ansatz werden daher Infektionen von Neuronen mit HSV-1 und PrV unter möglichst identischen Bedingungen durchgeführt und analysiert. Eine Aufklärung dieses Mechanismus könnte neue Strategien für antivirale Therapien aufzeigen.

INFEKTION MIT PSEUDORABIES VIRUS

Die primären Rattenneuronen wurden mit PrV infiziert, nach 18 Stunden fixiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Diese optimale Infektionszeit wurde zuvor in Kinetikstudien bestimmt. Ähnlich wie in nicht polarisierten permanenten Zellkulturen konnten die verschiedenen Stadien der Virusmorphogenese auch in Neuronen ultrastrukturell gezeigt werden (Abb. 3). So waren im Zellkörper neben verschiedenen Stadien der Kapsidbildung im Zellkern auch sekundäre Umhüllungsstadien im Zytoplasma sowie Virusfreisetzung an der Plasmamembran zu sehen. In den Axonen und an den Wachstumskegeln wurden hauptsächlich behüllte Virionen in Vesikeln beobachtet (Abb. 4). Weniger als 10 Prozent der dort beobachteten Viruspartikel bestanden aus unbehüllten Nukleokapsiden (Maresch *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der anterograde intraaxonale Transport wie bei der Exozytose im Zellkörper durch in Vesikeln eingeschlossene umhüllte Virionen erfolgt.

INFEKTION MIT HERPES SIMPLEX VIRUS TYP 1

Da in vergangenen Studien bei verschiedenen HSV-1 Wildtypstämmen unterschiedliche Transportformen beobachtet wurden, haben wir drei HSV-1 Stämme, HSV-1 HFEM, HSV-1 SC16 und HSV-1 17+, vergleichend untersucht. Die Neuronen wurden zwischen 16 und 24 h nach der Infektion elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. 5). Im Zellkörper waren wiederum ähnlich wie in nicht polarisierten Zellen bei allen drei Stämmen typische Stadien der Virusmorphogenese, wie z. B. primäre Umhüllung an der inneren Kernmembran oder sekundäre Umhüllung im Zytosol nachweisbar. In den Axonen und am Wachstumskegel wurden hauptsächlich behüllte Virionen in Vesikeln beobachtet, aber auch nackte Kapside waren vereinzelt zu sehen. Generell waren deutlich weniger Viruspartikel zu finden als in PrV infizierten Neuronen. Bei allen drei Stämmen lagen ca. 75 Prozent der

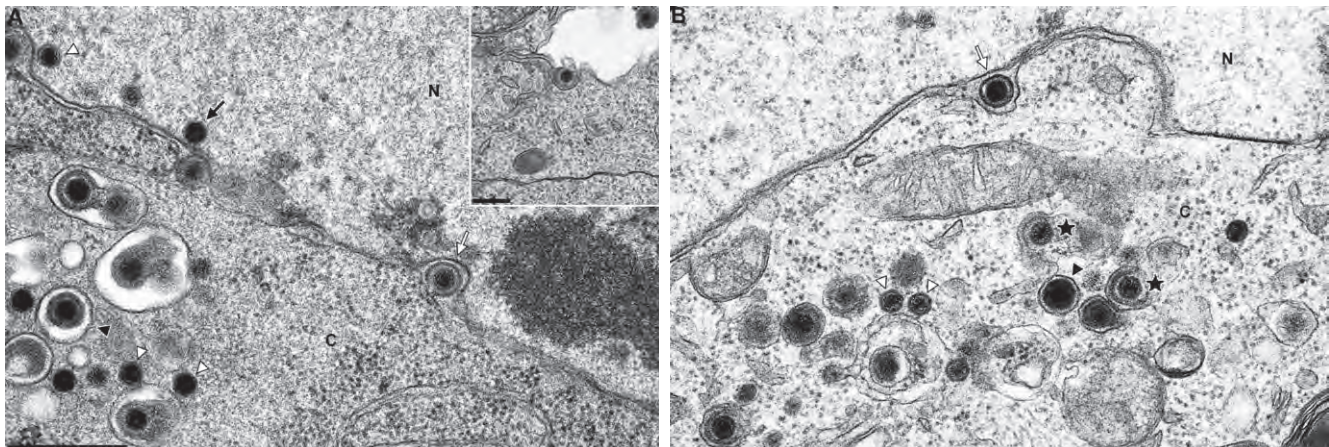


Abb. 3: Ultrastrukturelle Darstellung von Stadien der PrV-Morphogenese im neuronalen Zellkörper. Weiße Pfeile markieren primäre Umhüllungsstadien im perinukleären Spalt, behüllte Vesikel im Zytoplasma sind durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet. Weiße Dreiecke markieren nicht behüllte Nukleokapside im Zellkern und Zytoplasma. Stadien der sekundären Umhüllung sind mit Sternen gekennzeichnet. Der schwarze Pfeil in (A) markiert ein intranukleäres Nukleokapsid nahe der inneren Kernmembran. Im Inset ist Exozytose eines behüllten Virions zu sehen. Balken: 500 nm in A und B; 250 nm im Inset von A.

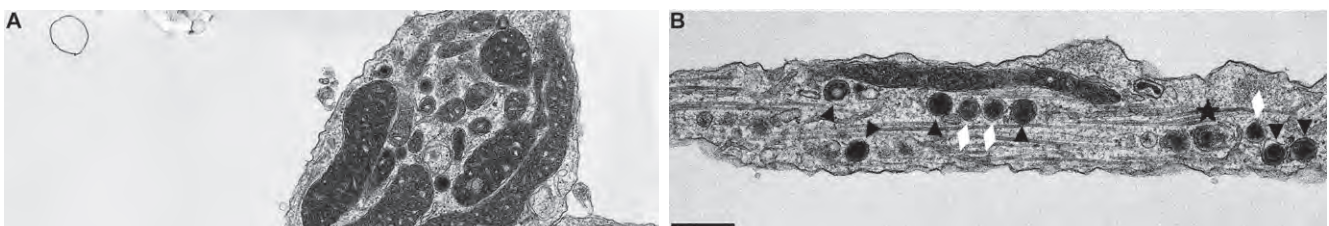


Abb. 4: Ultrastrukturelle Darstellung von Axon und Wachstumskegel eines PrV infizierten Neurons. (A) zeigt den terminalen Bereich eines Axons und den Wachstumskegel neben dem Zellkern eines weiteren infizierten Neurons, (B) stellt den axonalen Teil vergrößert dar. Schwarze Dreiecke markieren behüllte Virionen, weiße Rauten Neurovesikel. Partiiell behüllte Partikel sind mit Sternen markiert. Balken: 1,0 µm in A, 500 nm in B.

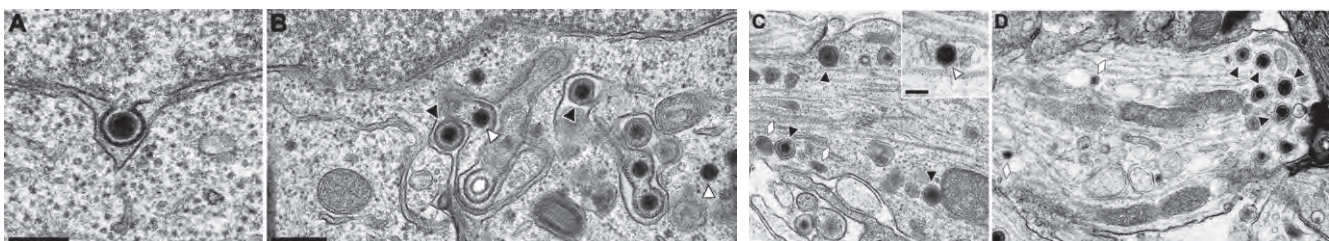


Abb. 5: Ultrastrukturanalyse von mit HSV-1 Stamm HFEM infizierten Neuronen. Die Aufnahmen zeigen unterschiedliche Stadien der Virusmorphogenese, wie z. B. primäre Umhüllung an der inneren Kernmembran (A) sowie sekundäre Umhüllung im Cytosol (B). Im Axon sind behüllte Virionen und Neurovesikel (C) sowie nackte Nukleokapside (C, Inset) zu sehen. Im Wachstumskegel liegen behüllte Virionen und Neurovesikel vor (D). Schwarze Dreiecke markieren behüllte Virionen, weiße Dreiecke unbehüllte Nukleokapside. Rauten zeigen die Neurovesikel. Balken: 200 nm in A, 300 nm in B, 500 nm in C und D, und 100 nm im Inset C.

intraaxonalen Viruspartikel als behüllte Virionen in Vesikeln und nur 25 Prozent als unbehüllte Nukleokapside vor (Negatsch *et al.*, 2010). Obwohl also ein anterograder Transport von Kapsiden nicht auszuschließen ist, wird HSV-1, wie PrV, überwiegend in Form von in Vesikeln eingeschlossenen umhüllten Virionen transportiert. Offensichtlich nutzen beide Herpesviren bei der Neuroinvasion ähnliche zellulärer Prozesse.

INFEKTION MIT TOLLWUTVIRUS

Vergleichend zu den Infektionen mit den Herpesviren wurden die primären Neuronen auch mit Tollwutvirus infiziert und 48 Stunden nach der Infektion ultrastrukturell untersucht. Wie bei den Herpesviren wurden auch in RABV infizierten Neuronen intraaxonal Viruspartikel gefunden, die von einer zellulären Membran umgeben waren und eine räumliche Assoziation zu Mikrotubuli aufwiesen (Abb. 6). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Arbeiten, in denen mit Hilfe der Lebendzell-Videomikroskopie der intraaxonale Transport von vollständigen, behüllten Viruspartikeln gezeigt werden konnte (Klingen *et al.*, 2008). Wenngleich eine eindeutige Zuordnung der elektronenmikroskopisch beobachteten Viruspartikel zu retrograden oder anterograden Transportprozessen bisher nicht möglich war, deuten strukturelle Ähnlichkeiten zu partikulären Strukturen im Soma von nichtpolarisierten Zellen (Finke *et al.*, 2010) und

Neuronen (nicht gezeigt) auf einen anterograden axonalen Transport von RABV Virionen innerhalb von Vesikeln hin. Dies ist ein völlig neuer Befund, da bisherige Modelle ausschließlich einen retrograden intraaxonalen Transport von RABV-Partikeln annehmen.

AUSBLICK

Weiterführende molekularbiologische und bildgebende Untersuchungen von infizierten Neuronen sollen zur genauen Identifizierung viraler Transportmechanismen und deren Auswirkungen auf die Virusvermehrung und -ausbreitung beitragen. Insbesondere die Verfügbarkeit von verschiedenen gentechnisch veränderten neurotrophen Herpes- und Rhabdoviren mit spezifischer Fluoreszenzmarkierung von Viruskomponenten ermöglicht jetzt die vergleichende Analyse von individuellen Transportprozessen mit einer sehr hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung. Offene Fragen zur Direktionalität von axonalen Transportprozessen werden mit kompartimentierten Zellkultursystemen untersucht, in denen gezielt Synapsen oder Zellkörper mit fluoreszenzmarkierten Viren infiziert werden können. Darüber hinaus soll der Einsatz unterschiedlicher Virusmutanten die Bedeutung einzelner viraler Proteine für die Neuroinvasion aufklären und virusspezifische sowie allgemeine Mechanismen neuronaler Transportprozesse weiter entschlüsseln.

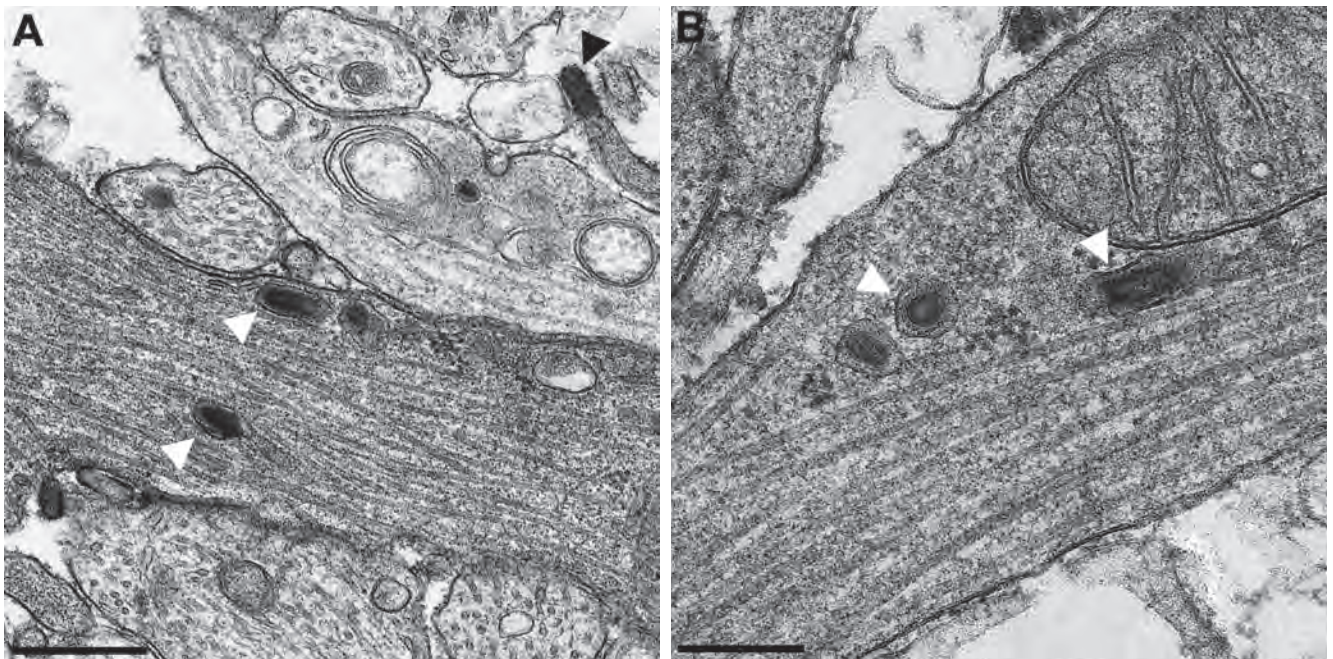


Abb. 6:

Ultrastrukturelle Darstellung von Viruspartikeln in Axonen primärer Rattenneuronen 48 h nach Infektion mit RABV. Die Aufnahmen zeigen virale Partikel, die im Gegensatz zu extrazellulären Virionen (schwarzes Dreieck) in mit Mikrotubuli assoziierten Transportvesikeln (weiße Dreiecke) lokalisiert sind. Balken: 500 nm in A, 250 nm in B.

LITERATUR

- CURANOVIC, D., AND L.W. ENQUIST. 2009. Directional transneuronal spread of α -herpesvirus infection. *Fut Virol* 4:591-603.
- DIEFENBACH, R.J., M. MIRANDA-SAKSENA, M.W. DOUGLAS, AND A.L. CUNNINGHAM. 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* 18:35-51.
- FINKE, S., K. BRZOZKA, AND K.K. CONZELMANN. 2004. Tracking fluorescence-labeled rabies virus: enhanced green fluorescent protein-tagged phosphoprotein P supports virus gene expression and formation of infectious particles. *J Virol* 78:12333-12343.
- FINKE, S., H. GRANZOW, J. HURST, R. POLLIN, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Intergenotypic replacement of lyssavirus matrix proteins demonstrates the role of lyssavirus M proteins in intracellular virus accumulation. *J Virol* 84:1816-1827.
- KLINGEN, Y., K.K. CONZELMANN, AND S. FINKE. 2008. Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. *J Virol* 82:237-245.
- MARESCH C., H. GRANZOW, A. NEGATSCH, B.G. KLUPP, W. FUCHS, J.P. TEIFKE, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Ultrastructural analysis of virion formation and anterograde intraaxonal transport of the alphaherpesvirus pseudorabies virus in primary neurons. *J Virol* 11:5528-5539.
- METTENLEITER, T.C., B.G. KLUPP, AND H. GRANZOW. 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* 143:222-234.
- NEGATSCH A., H. GRANZOW, C. MARESCH, B.G. KLUPP, W. FUCHS, J.P. TEIFKE, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Ultrastructural analysis of virion formation and intraaxonal transport of herpes simplex virus type 1 in primary rat neurons. *J Virol* 24:13031-13035

Institut für Virusdiagnostik (IVD)

MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE PORCINER INFLUENZAVIREN IN DEUTSCHLAND SEIT 2009

Elke Starick, Timm Harder, Elke Lange, Martin Beer

Seit dem Ausbruch der pandemischen Influenza A (H1N1) 2009, der sogenannten „Schweinegrippe“, sind Influenzavirusinfektionen des Schweines wieder eine viel diskutierte und beachtete Thematik in der Infektionsmedizin. Solche Infektionen sind beim Schwein weit verbreitet und besitzen klinische Bedeutung im Rahmen von akut verlaufenden respiratorischen Infekten, wobei insbesondere in Mastschweinbeständen auch wirtschaftlich bedeutsame Auswirkungen zu spüren sein können. Darüber hinaus spielen Influenzavirusinfektionen indirekt eine Rolle im Rahmen von Fruchtbarkeitsstörungen in Sauenbeständen: aufgrund der zum Teil hochfieberhaft verlaufenden Infektion kann es infolge der Hyperthermie bei tragenden Tieren zum Abort kommen. Bei allen anderen Tieren ähneln Symptome und Pathogenese von porcinen Influenzavirusinfektionen denen der saisonalen humanen Influenza, jedoch ist die Epidemiologie aufgrund der Strukturen in der Schweineproduktion deutlich von der humanen Infektionen verschieden. Insbesondere in Gegenden mit hoher Schweinedichte sind bei den meisten Schweinen am Ende der 6-monatigen Mastperiode Influenzavirusantikörper als Zeichen einer durchlaufenen Infektion nachweisbar. Dabei können viele der Tiere gleichzeitig oder nacheinander mit verschiedenen Subtypen infiziert werden. Im Unterschied zu humanen Influenzaviren zirkulieren porcine Influenzaviren das ganze Jahr über. SIV-Infektionen sind nicht melde- oder anzeigepflichtig, und es gibt in den Ländern der Europäischen Union (EU) keine harmonisierten oder routinemäßigen Überwachungsuntersuchungen, so dass Daten über das Auftreten und die Verbreitung von SIV sehr lückenhaft sind.

PORCINE INFLUENZAVIREN

Generell sind Schweine für dieselben Influenza A-Virus-Subtypen empfänglich wie Menschen (H1N1, H1N2, H3N2). Zusätzlich können Schweine aber auch als Infektionen mit aviären Influenzaviren erfahren, so dass es bei Doppelinfektionen von Schweinen mit humanen und aviären Influenzaviren zu genetischen Mischungen, also Reassortierungen der Genomsegmente, und der Entstehung neuer Influenzavirusgenotypen (Reassortanten) kommen kann. Aus diesem Grund wurde das Schwein auch als „Mischgefäß“ oder „*mixing vessel*“ der Influenzaviren bezeichnet. Historisch

war die Entwicklung der Influenzaviren von Mensch und Schwein über viele Jahrzehnte eng miteinander verknüpft. Allerdings war nahezu ausschließlich der Mensch Ausgangspunkt neuer Influenzavirus-Epizootien der Schweine, während die Rolle von Schweinen in der Entstehung pandemischer Viren des Menschen weiterhin umstritten bleibt. Es ist allerdings unstrittig, dass Schweinepopulationen ein Reservoir für Influenzaviren mit einem zoonotischen Potential darstellen, die respiratorische Erkrankungen beim Menschen verursachen und letztlich auch Beiträge zur Entstehung pandemischer Influenzaviren leisten können. Influenza A-Viren wurden erstmals 1930 aus Schweinen isoliert; hierbei handelte es sich um eine Variante des humanen H1N1-Influenzavirus, das 1918 die „Spanische Grippe“ ausgelöst hatte. Vertreter dieser Viruslinie zirkulieren bis heute in den Schweinepopulationen der U.S.A. und Kanadas. Andere Influenzalinienn und Subtypen haben seitdem ebenfalls ihren Weg in das Schwein gefunden. Hierbei spielten wiederum Menschen als Überträger eine entscheidende Rolle. So wurde das porcine H3N2-Virus Ende der 1960er Jahre parallel zu der im Menschen verlaufenden H3N2-Pandemie auch in Schweinepopulationen getragen und hat sich dort festgesetzt. Jedoch existiert in Europa auch eine Gruppe porciner Influenzaviren, deren Herkunft sich gänzlich aus einem aviären H1N1-Virus ableitet. Weitere Reassortierungsvorgänge dieser Linien untereinander, mit saisonalen Influenzaviren des Menschen oder mit anderen aviären Influenza-Subtypen haben seitdem das Bild der aktuell in Schweinen zirkulierenden Sub- und Genotypen stark diversifiziert. Auch existieren zwischen den Kontinenten Unterschiede der prävalent zirkulierenden Linien. Einen zusammenfassenden Überblick gibt Abbildung 1.

In den meisten schweineproduzierenden Ländern Westeuropas sind seit den 1980er Jahren H1N1- und H3N2-Schweineinfluenzaviren (SIV) enzootisch verbreitet. Die derzeit vorherrschenden H1N1-SIV in Europa sind durch ein reines aviäres Influenzavirusgenom gekennzeichnet – das Virus wurde 1979 ohne weitere Reassortierungsprozesse offenbar von Wildenten auf Schweine übertragen. Sie werden daher als „avian-like“ H1N1-Viren bezeichnet und sind genetisch und in ihren antigenen Eigenschaften verschieden von den „klassischen Schwein-“, H1N1-Viren, die in Nordamerika und Asien vorherrschen und dem pandemischen H1N1-Virus

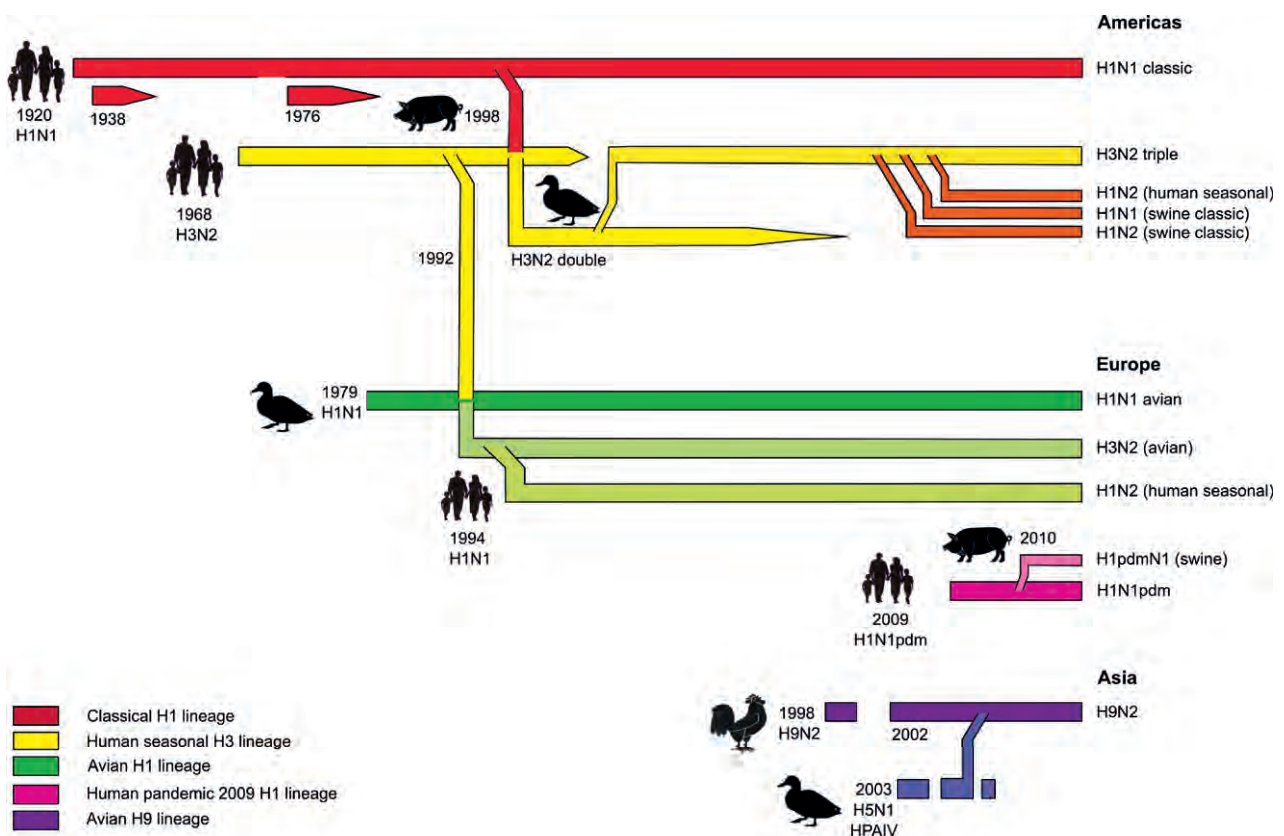


Abb. 1:

Ursprung der verschiedenen porcinen Influenzaviruslinien sowie der Austausch genetischer Informationen zwischen Linien porciner, aviärer und humaner Herkunft: In den U.S.A. (Amerika) koexistieren derzeit verschiedene Linien beim Schwein. Das „klassische“ H1N1-Virus entstammt dem humanen H1N1-Virus der Spanischen Grippe von 1918. Daneben tritt eine sogenannte Tripelreassortante auf, deren HA und NA Segmente dem humanen Pandemievirus H3N2 von 1968 entstammen. Weitere Genomsegmente leiten sich aus dem klassischen H1N1-Virus sowie unbekanntem aviären Influenzaviren ab. Zusätzliche Reassortierungen dieses Virus mit aktuellen humanen H1N1- und H3N2-Viren komplizieren das Bild zusätzlich. In Europa herrschen drei porcine Influenzalinien vor. Das H1N1-Virus ist rein aviären Ursprungs. Dieses Virus hat auch sechs Genomsegmente zur H3N2-Reassortante europäischer Prägung beigesteuert. Eine weitere Reassortierung dieses H3N2-Virus mit humanen saisonalen H1N1-Viren brachte das H1N2-Virus hervor. Auch in Europa existieren weitere Reassortanten dieser Viren untereinander oder mit humanen saisonalen Viren. In Asien schließlich finden sich Vertreter sowohl der europäischen als auch der amerikanischen Influenzaviruslinien, und auch Reassortanten zwischen diesen Linien sind beschrieben worden (hier nicht dargestellt). Als Besonderheit tritt in Asien, insbesondere in China, ein H9N2-Virus bei Schweinen auf, das ebenfalls im Wesentlichen aviärer Herkunft ist. Jüngere Isolate dieses Virus weisen auf Reassortierungen mit dem hochpathogenen aviären Influenzavirus des Subtyps H5N1 hin, das in Indonesien auch bereits vereinzelt in Schweinen nachgewiesen wurde.

von 1918 entstammen. Während das H1N1-Virus vollständig aviären Ursprungs ist, stammen die Hämagglutinin- und Neuraminidasesegmente des H3N2-Virus aus dem saisonalen menschlichen H3N2-Virus. H1N2-Viren dagegen haben erst in den letzten zehn Jahren Verbreitung in europäischen Schweinen gefunden (2). Hierbei handelt es sich um eine Reassortante aus dem porcinen H3N2-Virus mit einem humanen saisonalen Grippevirus des Subtyps H1N1. Serologische Untersuchungen in Belgien, Deutschland, Italien und Spanien 2002–2003 zeigten, dass in den dortigen Schweinebeständen alle drei Subtypen zeitgleich koexistierten. In zentral- und osteuropäischen Ländern, wie in der Tschechischen Republik oder Polen, dominierte dagegen H1N1 (4). Darüber hinaus sind in den letzten Jahren in Europa eine Reihe neuer, durch Reassortierung entstandene

Influenzaviren von Schweinen beschrieben worden, die sich jedoch bislang offenbar nicht weiter verbreitet haben (1, 5).

DIAGNOSTIK PORCINER INFLUENZAVIREN AM FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

Lungengewebe (aus Sektionen verendeter Schweine bzw. Schlachtschweinelungen) oder Nasentupferproben von Schweinen wurden in einer generischen (M-Gen) real-time RT-PCR (RT-qPCR) auf das Vorkommen von Influenza A-Virus-RNA untersucht. Zugleich wurde in drei weiteren RT-qPCR getestet, ob Hämagglutinin vom Subtyp H1 (pandemisch/2009 oder „avian-like“ SIV) und Neuraminidase vom Subtyp N1 nachweisbar sind. Positive Proben wurden in

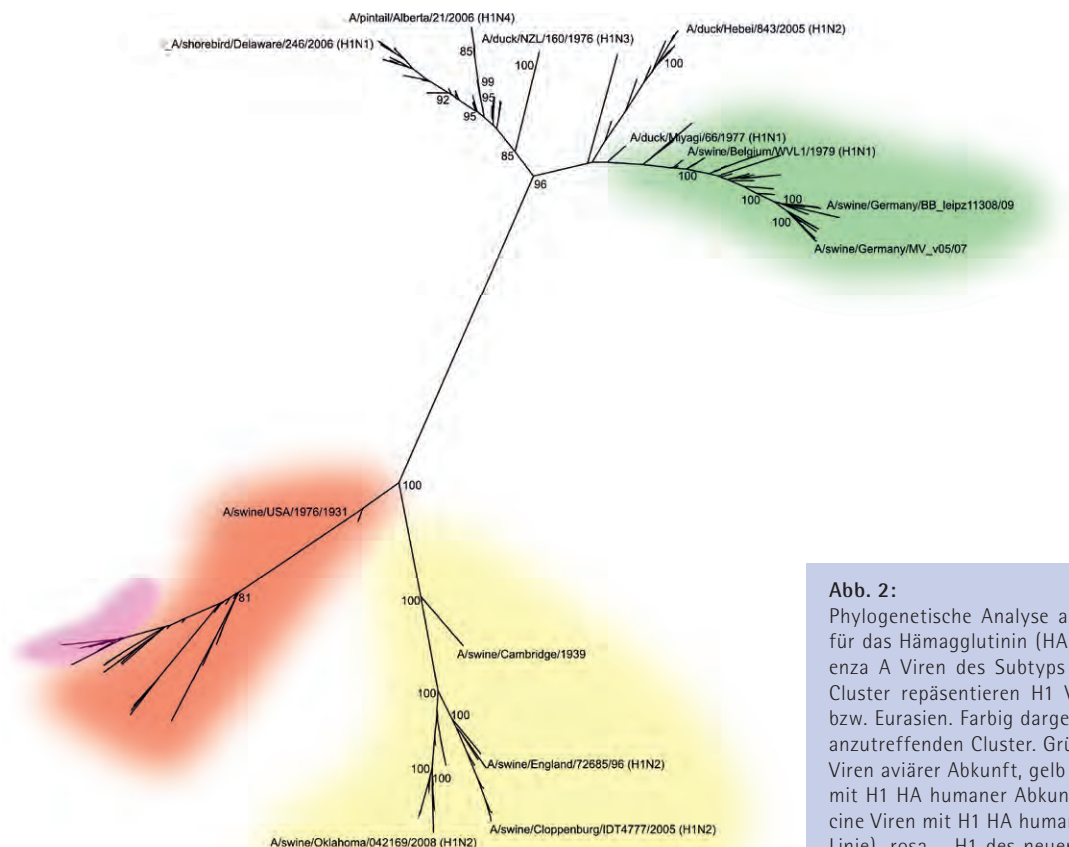


Abb. 2: Phylogenetische Analyse ausgewählter Sequenzen des für das Hämagglutinin (HA) kodierende Gen von Influenza A Viren des Subtyps H1. Farblich nicht separierte Cluster repräsentieren H1 Viren der Vögel in Amerika bzw. Eurasien. Farblich dargestellt sind die beim Schwein anzutreffenden Cluster. Grün – europäische porcine H1 Viren aviärer Abkunft, gelb – europäische porcine Viren mit H1 HA humaner Abkunft („klassische“ H1 Linie), rosa – H1 des neuen pandemischen H1N1 Virus 2009 (H1N1pdm).

Abhängigkeit von ihrem Gehalt an viraler RNA (Ct-Wert der RT-qPCR) mit Hilfe verschiedener konventioneller RT-PCR-Methoden weiter molekular charakterisiert. Dabei reichte das Spektrum der Charakterisierung von der Subtypisierung der beiden Oberflächenproteine HA und NA anhand kurzer Fragmente bis zur Sequenzierung kompletter Gensegmente. Proben mit Ct-Werten unter 30 wurden zum Zweck der Virusisolierung auf MDCK-Zellen verimpft. Nach jeweils drei Passagen wurden Isolate im Hämagglutinationstest identifiziert und serologisch mittels Hämagglutinationshemmtest (HAH) charakterisiert. Das Ergebnis wurde gegebenenfalls mittels Serumneutralisationstest überprüft und die Isolate für eine weiterführende molekulare Charakterisierung genutzt, insbesondere zur Bestimmung der Sequenz des gesamten Genomes einschließlich Genotypisierung.

SCHWEINEINFLUENZA IN DEUTSCHLAND – ERSTE EINBLICKE NACH ZWEIJÄHRIGEM MONITORING

Im vergangenen Jahr wurden 212 Proben, die von den Untersuchungsämtern an das FLI gesandt worden waren, im Nationalen und OIE-Referenzlabor (NRL) für Aviäre Influenza (AI) auf SIV untersucht. Darüber hinaus wurden im Rah-

men des Forschungs-Sofortprogrammes zur pandemischen Influenza H1N1/2009 des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) Lungen- bzw. Tupferproben von 401 Tieren bearbeitet, die in der Außenstelle für Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover in Bakum (Frau Professor große Beilage), von klinisch auffälligen Beständen 2009 und 2010 gesammelt wurden. Die Untersuchung der 401 Lungenproben erbrachte 86 SIV-positive Ergebnisse in der generischen RT-qPCR. Das entspricht 21,4 Prozent der Proben. Dabei wiesen 52 Proben Ct-Werte über 30 und die verbleibenden 34 Proben Ct-Werte unter 30 auf. Nur 13 Proben reagierten mit Werten von unter 25. Von 14 Proben konnte auf Zellkulturen Virus isoliert werden. Die Subtypisierung der Proben mittels RT-PCR und Serologie ergab, dass alle drei bei Schweinen in Europa üblicherweise zu erwartenden Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 nachgewiesen werden konnten, wobei Viren vom Subtyp H1 deutlich überwogen (H1N1: n=13, H1N2: n=7, H1Nx: n=7, H3N2: n=6).

Bei einer der Proben aus Bakum (R369/09) und zwei weiteren Proben aus Einsendungen (R3394/09 und R432/10, beide aus Niedersachsen) wurden widersprüchliche Ergebnisse zwischen RT-PCR und Serologie hinsichtlich des



Subtyps erzielt: Zwei Proben reagierten im HAH nur mit H1N2-Antigenen (Titer größer 1:1000), die Sequenzierung wies jedoch H1N1 nach; eine weitere Probe reagierte nur mit H1N1-Antigenen mit Titern größer 1:1000, trägt jedoch eine Neuraminidase vom Subtyp N2. Die Analyse der Sequenzierergebnisse dieser Proben sprechen für eine Reassortierung dieser Viren (Tab. 1).

Insgesamt konnte Virus aus 33 Proben molekular charakterisiert werden, wobei der Umfang der erhaltenen Daten variiert: von einigen Viren konnten nur Subtyp und Verwandtschaftsverhältnisse zu bekannten Sequenzen ermittelt werden, von anderen Proben (n = 16) wurden die Sequenzen der für die Oberflächenproteine HA und NA kodierenden Gene oder für das Gesamtgenom (n = 7) bestimmt (Tab. 2).

R-Nr.	Subtype	HA		NA		gesamtes Genom	Bemerkung
		komplett	partial	komplett	partial		
R 211	H1N1	√		√			
R248	H1N1	√		√		√	
R255	H1Nx	∅	630nt (HA2-PCR)	∅	∅		phylogenetisch „altes“ HA
R299	H1N2	√		√		√	
R325	H3N2	√		√		√	
R369	H1N2 Serologie: H1N1	√		√		√	Reassortment? H1 von H1N1 N2 von H1N2
R432	H1N1 Serologie: H1N2	√		√			Reassortment? H1 von H1N2 N1 von H1N1
R494	H3N2	√		√			
R757	H1N2	√		√		√	Reassortment? H1 von H1N2 N2 von H3N2
R819	H1N1	√			nt135-STOP	√	NA speziell (geringe Identitäten)
R825	H1Nx	∅	580nt (HA2-PCR)	∅	∅		
R856	H1N2	√		√		√	Reassortment? H1 von H1N2 N2 von H3N2
R3394	H1N1 Serologie: H1N2	√		√			Reassortment? H1 von H1N2 N1 von H1N1

Tabelle 1: Verfügbarkeit und molekulare Analyse von Sequenzdaten ausgewählter SIV-Isolate

Influenza virus	Subtype	Segments†	Acc.No.
A/swine/Germany-BB/siv-leipz11308/09	H1N1	8	EPI248486 – 493
A/swine/Germany-SN/siv-leipz243/09	H1N1	HA, NA	EPI248502 – 503
A/swine/Germany-SN/siv-leipz6340/09	H1N1	HA, NA	EPI248504 – 505
A/swine/Germany-SN/siv-leipz8826/09	H1N1	HA, NA	EPI248506 – 507
A/swine/Germany-NI/R211/09	H1N1	HA, NA	EPI278637 – 638
A/swine/Germany-NI/R248/09	H1N1	HA, NA	EPI278639 – 640
A/swine/Germany-NI/R255/09	H1N1	HA part. (nt [§] 1073-1701)	EPI278641
A/swine/Germany-NI/R258/09	H1N1	HA, NA	EPI278642 – 643
A/swine/Germany-SH/R1737/09	H1N1	8	EPI248478 – 485
A/swine/Germany-TH/R2241/09	H1N1	HA, NA	EPI278644 – 645
A/swine/Germany-NI/R3394/09	H1N1	HA, NA	EPI1278646 – 647
A/swine/Germany-SH/R402/10	H1N1	HA, NA	EPI1278648 – 649
A/swine/Germany-NRW/R705/10	H1N1	HA part., NA (nt 214-1701)	EPI278650 – 651
A/swine/Germany-RP/R3314/09	H1N1pdm	HA part., NA (nt 524-1745)	EPI244101 – 102
A/swine/Germany-SH/R397/10	H1N1pdm	HA, NA	
A/swine/Germany-NRW/R708/10	H1N1reassortant	8 (NP part.: nt 1-764)	

* percentage nucleotide identity of the NA genome segment sequence of the isolate indicated and R708/10.

† number or type of genome segment sequenced; part: partial sequence

§ nucleotides

Tabelle 2: Sequenzdaten deutscher SIV Isolate (Subtyp H1) aus den Jahren 2009/2010 und Vergleich der Nukleinsäure-Identitäten mit dem Neuramidasegment des reassortierten SIV H1N1 R708/10.

PANDEMISCHES INFLUENZAVIRUS A (H1N1) 2009

Seit April 2009 zirkuliert bei Menschen ein seiner Herkunft nach neues H1N1-Virus, das sich im Verlaufe des Jahres 2009 von Mittelamerika und den südlichen U.S.A. ausgehend pandemisch verbreitet hat. Dieses als humanes pandemisches Virus A (H1N1) 2009 (abgekürzt: H1N1pdm) bezeichnete Agens ist eine Reassortante, deren Genomsegmente aus vermutlich mindestens vier phylogenetischen Influenzavirus-Linien resultieren. Die Mehrzahl dieser Li-

nien stammt aus Schweinen. H1N1pdm hat mittlerweile das seit 1977 zirkulierende saisonale humane H1N1-Virus nahezu vollständig verdrängt. Bereits 2009 wurde deutlich, dass auch Schweine hochempfindlich für H1N1pdm sind und sich stabile Infektketten in Schweinepopulationen etablieren können. Aus verschiedenen Ländern wurden Fälle von H1N1pdm Infektionen bei Schweinen gemeldet, die auf Übertragungen von infizierten Menschen zurückgeführt werden konnten.



In dem in den vergangenen zwei Jahren an das NRL AI eingesandten porcinen Untersuchungsmaterial wurde in drei Proben (je eine Probe aus RP, HE und NW) H1N1pdm nachgewiesen.

Bei einer dieser Proben konnte gezeigt werden, dass hier eine Reassortierung zwischen H1N1pdm und europäischem („avian-like“) SIV stattgefunden hatte: Die virale RNA dieser Probe setzt sich dabei aus sieben Segmenten von H1N1pdm und einem von SIV abstammenden NA-Gen zusammen (Tab. 3). Eine retrospektive zeitnahe Befragung ergab keine Hinweise auf eine Influenzainfektion der Personen mit Kontakt zu dem Bestand. Auch die phylogenetische Analyse der NA-Sequenz lieferte keine belastbaren Aussagen darüber, ob die Reassortierung im Bestand oder schon früher stattgefunden hatte (3). Da, wie oben ausgeführt, Schweinebestände in Deutschland bisher nicht systematisch beprobt werden, kann über das tatsächliche Vorkommen von H1N1pdm durch Übertragung vom Menschen auf das Schwein und eventuelle Reassortierungen mit verschiedenen SIV nur spekuliert werden. Um einen besseren Einblick in diese Fragestellung zu erhalten, sind jetzt von Seiten des FLI verschiedene Pro-

jekte zum Erhalt von Probenmaterial initiiert worden.

Insgesamt lässt sich aus den bisherigen Analysen der gewonnenen Ergebnisse ableiten, dass nach wie vor alle drei bekannten europäischen SIV-Subtypen in der Schweinepopulation Deutschlands zirkulieren, wobei eine Verschiebung des Schwerpunktes zu H1N1-Viren aufzutreten scheint. Innerhalb des Subtypes H1 konnten sowohl eine Vielfalt an antigenetisch und phylogenetisch unterscheidbaren Viren als auch Reassortierungen mit vermutlich H1N2- und H3N2-Viren porciner Herkunft nachgewiesen werden. Eine Analyse der Datenlage in öffentlichen Genbanken zeigt, dass für Europa aus den letzten 20 Jahren lediglich Sequenzen von 60 SIV (davon 33 aus Deutschland) vorliegen und nur von 25 Viren das gesamte Genom sequenziert wurde. Dadurch bedingte Lücken bei vergleichenden und phylogenetischen Untersuchungen erschweren sowohl die Interpretation der Virusentwicklung als auch epidemiologische Aussagen sowie solche zu Virusübertragungen zwischen verschiedenen Spezies. Insgesamt leisten damit die hier vorgestellten Ergebnisse einen Beitrag zum besseren Verständnis des Schweineinfluenzageschehens in Deutschland.

Isolat	Virus with the highest identity				
	HA	NA			
R3314/09	CY039527	GQ502908			
	A/Netherlands/602/2009	A/Toronto/R8557/2009			
R397/10	GU576542	GU576507			
	A/Ancona/01/2010	A/Ancona/17/2009			
R708/10	HQ011423	EPI1278638 / -640	PB2 CY060531	PB1 CY069639	PA GU451253
	A/Guangdong/55/2009	A/swine/Germany-NI/ R211 and 248/09	A/Ontario/ 237882/2009	A/Singapore/ 527/2009	A/Tver/ IIV2969/2009
			NP (partial) CY046782	M CY065897	NS CY065868
			A/Wisconsin/ 629-D01894/2009	A/Netherlands/ 2822/2009	A/Netherlands/ 1493b/2009

Tabelle 3: Genetische Vergleiche der H1N1pdm Isolate, die in Deutschland beim Schwein isoliert wurden, mit Referenzsequenzen aus der GenBank belegen die Reassortierung des H1N1-Isolates R708/10

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Zukünftig erscheint eine weitere Intensivierung der Untersuchung porciner Influenzavirusinfektionen geboten. Die Umstrukturierungen in der landwirtschaftlichen Haltung von Schweinen in Richtung einer hocheffizienten industriellen Produktion könnten Influenzaviren neue Möglichkeiten der Verbreitung und Persistenz in den Beständen

bieten. Insgesamt könnte so eine weitere Diversifizierung porciner Influenzaviren forciert und der Genaustausch zwischen aviären, humanen und porcinen Influenzaviruslinien weiter gefördert werden. Nur durch ein intensives Monitoring zur repräsentativen Stammsammlung mit nachfolgender, auch molekularer und phylogenetischer Charakterisierung, kann diese Problematik angemessen untersucht und berücksichtigt werden.

LITERATUR

- BALINT, A., G. METREVELI, F. WIDEN, S. ZOHARI, M. BERG, M. ISAKSSON, L.H. RENSTRÖM, P. WALLGREN, S. BELAK, AND I. KISS. 2009. The first Swedish H1N2 swine influenza virus isolate represents an uncommon reassortant. *Virology* 6:180.
- BROWN, I.H. 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology* 74:29-46
- STARICK, E., E. LANGE, S. FEREIDOUNI, C. BUNZENTHAL, R. HÖVELER, A. KUCZKA, E. GROSSE BEILAGE, H.P. HAMANN, I. KLINGELHÖFER, D. STEINHAEUER, T. VAHLENKAMP, M. BEER, AND T. HARDER. 2011. Reassorted pandemic (H1N1)2009 influenza virus isolated from pigs in Germany. *Journal of General Virology* (accepted)
- VAN REETH, K., I.H. BROWN, R. DÜRRWALD, E. FONI, G. LABARQUE, P. LENIHAN, J. MALDONADO, I. MARKOWSKA-DANIEL, M. PENSAERT, Z. POSPISIL, AND G. KOCH. 2008. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2:99-105.
- ZELL, R., S. BERGMANN, A. KRUMBHOLZ, P. WUTZLER, AND R. DÜRRWALD. 2008. Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant. *Archives of Virology* 153:2085-92

Institut für Infektionsmedizin (IMED)

RANAVIREN – TAXONOMIE, REPLIKATION UND DIAGNOSTIK

Heike Schütze, Stefanie Ohlemeyer, Sven M. Bergmann, Harald Granzow

Ranaviren sind weltweit verbreitete Erreger aus der Familie *Iridoviridae*. Sie verursachen systemische Infektionen mit vorrangig fokalen hämorrhagischen Nekrosen in inneren Organen, wie Leber, Milz, Niere und Darm. Das Wirtsspektrum der Viren umfasst Fische, Amphibien und Reptilien. Die Infektionen von Tieren sowohl in freien Gewässern als auch in Aquakultur sind in der Regel von hohen Mortalitäten begleitet.

Einzelne Erreger, wie das Epizootische Hämatopoetische Nekrose Virus (EHNV) oder das European Sheatfish Virus (ESV), sind für Massensterben innerhalb einer Wirtsspezies verantwortlich und somit in der Aquakultur von besonderer ökonomischer Bedeutung. Im Zusammenhang mit dem weltweit zu verzeichnenden Rückgang vieler Amphibienpopulationen spielen auch die Ranaviren Frog Virus 3 (FV3) und Bohle Iridovirus (BIV) eine wesentliche Rolle.

Daher wurden seit 2006 EHNV und Ranaviren der Amphibien von der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) in die Liste der exotischen Tierseuchenerreger aufgenommen. Seit 2008 besteht in Europa Anzeigepflicht.

TAXONOMIE

Ranaviren werden in dem Genus *Ranavirus* innerhalb der Familie *Iridoviridae* klassifiziert (Fauquet *et al.*, 2005). Weitere Genera in dieser Familie sind *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus* und *Megalocytivirus*. Vertreter der Genera *Iridovirus* und *Chloriridovirus* infizieren Invertebraten, wobei das derzeit bekannte Wirtsspektrum Arthropoden umfasst. In den Genera *Lymphocystivirus* und *Megalocytivirus* sind fischpathogene Iridoviren klassifiziert. Vertreter des Genus *Ranavirus* infizieren sowohl Fische als auch Amphibien und Reptilien. Die Virulenz verschiedener Ranaviren ist dabei nicht nur auf eine Wirtsspezies beschränkt. So verursacht z. B. das BIV hohe Mortalitäten sowohl bei Grabfroschkaulquappen (*Limnodynastes omatus*) als auch bei australischen Riesenbarschen (Barramundi; *Lates calcarifer*).

Derzeit bekannte und klassifizierte Ranavirusspezies sind Ambystoma Tigrinum Virus (ATV), BIV, EHNV, European Catfish Virus (ECV), FV3 und Santee-Cooper Ranavirus (SCRV). Dem Genus *Ranavirus* vorläufig zugeordnet sind das Rana Esculenta Iridovirus (REIR), das Singapore Grouper Iridovirus (SGIV) und das Testudo Iridovirus (ThIV).

Als Merkmale zur Unterscheidung der Spezies innerhalb des Genus *Ranavirus* werden Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP), Proteinprofile, Gen-Sequenzen und

Wirtsspezifitäten herangezogen. Die genetische Unterscheidung erfolgt vorrangig auf der Basis des Hauptstrukturproteins (MCP, major capsid protein).

VERBREITUNG

Ranaviren infizieren wechselwarme Tierspezies, die in feuchter oder aquatischer Umwelt leben (Whittington *et al.*, 2009). Eine Infektion ist über die Futtermittelaufnahme, parenteral oder durch Exposition in virusbelastetem Milieu möglich. Dabei ist die Ausprägung der Symptome (akuter oder subklinischer Verlauf) von der Wirtsspezies, deren Alter und Konstitution sowie den Umweltbedingungen abhängig. BIV kann auch von Amphibien auf Fische übertragen werden.

- Ranaviren der Amphibien und Reptilien

Das Studium der Ranaviren begann 1965 mit der Isolierung des FV3 aus nordamerikanischen Leopardfröschen (*Rana pipiens*). Dieser Erreger gilt seither als Referenzvirus innerhalb des Genus *Ranavirus*. BIV (1991), ATV (1996) sowie das REIR (1991) sind weitere Ranaviren, die schwere Erkrankungen in Amphibien auslösen.

Aus moribunden Teichfröschen 1991 in Kroatien isoliert, löste das BIV ein Jahr später hohe Mortalitäten bei Grabfrosch-Kaulquappen in Australien (Queensland) aus. In Infektionsversuchen wurde gezeigt, dass dieser Erreger in australischen Riesenbarschen (Barramundi) Mortalitäten von bis zu 100 Prozent verursachen kann.

In den Folgejahren wurden seitdem FV3 verwandte Erreger sowohl von gesunden und erkrankten Fröschen in Wild- oder Farmbeständen in Amerika, Europa und Asien, als auch von frei lebenden Salamandern (*Ambystoma maculatum*) in Nordamerika und Bergmolchen (*Mesotriton alpestris*) in Spanien isoliert.

Reptilien sind ebenfalls für FV3 verwandte Erreger empfänglich. In Australien wurde 1998 das Wamena Virus (WV) aus erkrankten grünen Baumpythonen (*Chondropython viridis*) isoliert, die aus West Papua stammten. Verantwortlich für die Erkrankung griechischer Landschildkröten (*Testudo hermanni*) in Europa im Jahr 1999 war ebenfalls ein Ranavirus.

- Ranaviren der Fische

In den letzten Jahren wurde eine weltweite Verbreitung der Ranaviren in der Fischpopulation festgestellt. Besondere Aufmerksamkeit erregte dabei das 1986 aus Fischen iso-

lierte Ranavirus der Epizootischen Hämatopoetischen Nekrose (EHN). Dieser Erreger (EHNV) verursachte hohe Mortalitäten in juvenilen Flussbarschen und hohe Morbiditäten in Regenbogenforellen. Somit wurde er folgerichtig 2006 in die Liste der exotischen Tierseuchenerreger der OIE aufgenommen. Seit 2008 besteht in Europa und Deutschland Anzeigepflicht (Richtlinie 2006/88/EG des Rates vom 24. Oktober 2006 mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten, Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November).

Verwandte Erreger sind das ESV und das ECV, die erstmals 1989 und 1990 in Deutschland und Frankreich massive Verluste bei Welsen (*Silurus glanis*, *Ameiurus melas*) sowohl in der Wildtierpopulation als auch in der Aquakultur verursachten. Molekularbiologische Daten bestätigen eine sehr nahe Verwandtschaft beider Erreger zum EHNV. Dennoch wurde EHNV bislang nicht in Europa und ECV/ESV nicht in Australien nachgewiesen.

Die Grouper Iridoviren (SGIV und GIV) verursachten in den 1990er Jahren ökonomisch bedeutsame Verluste in Fischfarmen Asiens. Davon betroffen war vorwiegend der Zackenbarsch. In diesem Zusammenhang erfolgte die erstmalige Isolierung von Ranaviren aus Fischen eines marinen Reservoirs.

Die Santee-Cooper Ranaviren Guppy Virus 6 (GV6) und Doctorfish Virus (DFV) wurden 1995 in den USA von aus Südostasien importierten Süßwasserfischen Guppy (*Poecilia reticulata*) und Putzerlippfisch (*Labroides dimidiatus*) isoliert. Im selben Jahr verursachte das Largemouth Bass Virus (LMBV) hohe Morbiditäten in Forellenbarschen (*Micropterus salmoides*) des Santee-Cooper Reservoirs in South Carolina. Im Rahmen von Routineuntersuchungen wurde 1998 in Finnland das Pike Perch Iridovirus aus gesunden jungen Zandern (*Stizostedion lucioperca*) isoliert. Eine Übertragung

auf andere ökonomisch bedeutsame Fischarten konnte experimentell nicht nachgewiesen werden.

1999 wurde in Italien das Shortfin Eel Virus (SERV) aus importierten australischen Aalen (Shortfin eel, *Anguilla australis*) isoliert.

VIRUSEIGENSCHAFTEN

Ranaviren sind isometrisch aufgebaute Partikel mit einem Durchmesser von 120 bis 200 Nanometer, in Ausnahmen bis 350 Nanometer. Die Kapside umschließen ein doppelsträngiges DNA Genom, das von einer inneren Lipidmembran umgeben ist. Ihr aufsitzende Kapsomere formen ein isometrisches Nukleokapsid. In diese innere Lipidmembran sind Transmembranproteine unbekannter Funktion, wie z. B. das Hauptstrukturprotein (major capsid protein, MCP) eingelagert. Etwa 40 Prozent des Gesamtproteingehaltes der Virionen bildet das ca. 49 kDa MCP.

Der Genomvergleich verschiedener Ranaviren ergab grundlegende Unterschiede in der Genomorganisation. Das Genom weist eine Gesamtlänge von 105 bis 140 Kilobasenpaaren mit einem G+C Gehalt von 49-54 Prozent auf. Charakteristisch sind zirkuläre Permutation und eine terminale Redundanz von 5 bis 50 Prozent. Das Genom kodiert für eine Vielzahl von Strukturproteinen. Für das FV3 wurden 30 verschiedene Strukturproteine identifiziert. Das Genom des Tiger Frog Virus (TFG) enthält mindestens 100 offene Leserahmen (open reading frame, ORF).

Einzelne Stadien der Iridovirusmorphogenese sind vorrangig am Beispiel des FV3 untersucht worden. Die Virusaufnahme in die Zelle erfolgt nach Adsorption der Virionen an die Zellmembran über eine rezeptorvermittelte Endozytose. Nach Freisetzung der Nukleinsäure findet die virale DNA-Synthese im Zellkern statt. Im Zytoplasma wird diese anschließend methyliert und es kommt zur Bildung von Konkatemeren. Darauf folgt die Synthese der viralen Proteine. Die DNA Ver-

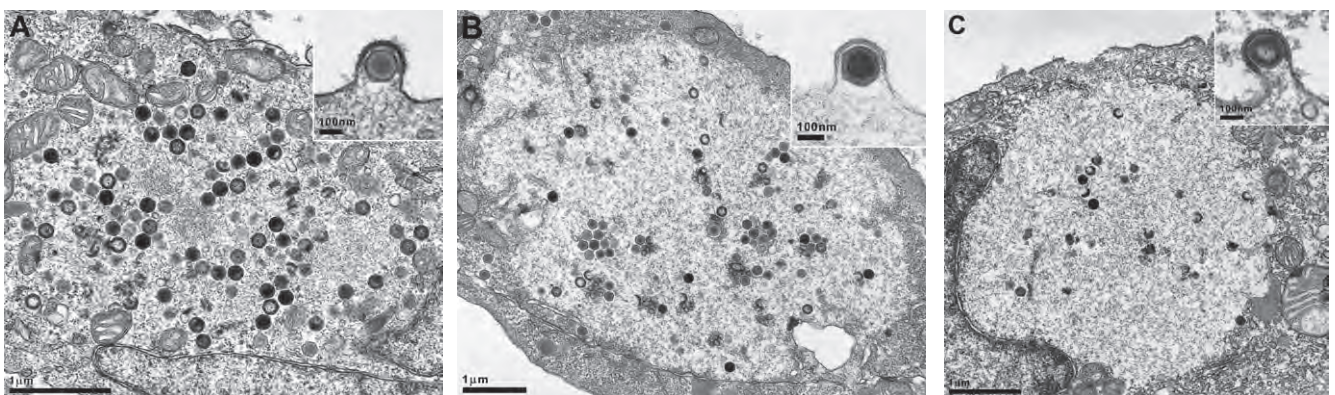


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung der Ranaviren FV3, EHNV und SERV im Ultradünnschnitt infizierter Zellen. Infektiöse Virionen akkumulieren im Zytoplasma (Marker 1 µm) oder werden an der Zellmembran durch Knospung freigesetzt (Inset, Marker 100 nm). A: FV3, B: EHNV, C: SERV

packung und Bildung der Nukleokapside findet in morphologisch deutlich erkennbaren Bereichen des Zytoplasmas, sogenannten „Virusfabriken (virus factories)“, statt. Infektiöse Virionen können anschließend pseudokristallin in diesen Arealen akkumulieren oder aber durch Knospung (budding) an der Zellmembran freigesetzt werden (Abb. 1).

Ranaviren haben in der Zellkultur eine im Verhältnis zu anderen Viren niedrige optimale Wachstumstemperatur von 15 °C.

Die Virionen bleiben auch bei Wassertemperaturen von 4 °C bis 42 °C über lange Zeiträume infektiös. Einer Studie von Langdon (1989) zufolge ist EHNV auch nach 15 Minuten bei 60 °C noch infektiös. Der Erreger ist darüber hinaus extrem resistent gegenüber Trockenheit und nach mehr als zwei Jahren in gefrorenem Fischgewebe und Kadavern noch immer virulent. Eine schnelle Inaktivierung der Viren erfolgt durch Ether, Chloroform, Natriumdeoxychlorat, Phospholipase A oder einem pH-Wert von 2.0 bis 3.0.

DIAGNOSTIK

Diagnoseverfahren sind für die Erkennung und Differenzierung von Ranavirusinfektionen zwingend erforderlich und gleichzeitig ein wesentlicher Bestandteil der Überwachung und Kontrolle des grenzüberschreitenden Handels.

Empfohlen werden derzeit die Virusisolierung in Zellkultur, immunologische Verfahren zum Antigen-Nachweis (Immunhistochemie, Immunofluoreszenz), serologische Methoden (ELISA) oder der Genomnachweis (PCR). Vorgaben zur Diagnose von EHNV und Ranaviren der Amphibien sind im „Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals“ der OIE aufgelistet.

Mit Ausnahme der Grouper Iridoviren besitzen Ranaviren gruppenspezifische Antigene. Somit ist eine eindeutige Differenzierung der Ranaviren, auf der Basis ihres Antigenprofils, nicht möglich.

Verschiedene diagnostische PCR wurden zur Identifizierung von Ranaviren entwickelt. Diese basieren auf der Analyse von Genabschnitten, die für das MCP, die Thymidinkinase, die virale DNA-Polymerase oder das Neurofilament triplet H1-like Protein (NF-H1) kodieren.

Das MCP Gen ist hoch konserviert und daher besonders zur genetischen Differenzierung der Ranaviren geeignet (Hyatt *et al.*, 2000). Es weist eine Länge von 1392 Basenpaaren auf und kodiert für ein ca. 49 kDa Protein. Partielle und vollständige MCP Gensequenzen von Ranaviren sind bereits in der GenBank verfügbar. Mit den bislang empfohlenen diagnostischen Methoden war ein Nachweis der Santee-Cooper Ranaviren leider nicht möglich. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, eine diagnostische Methode zu etablieren, die eine möglichst schnelle und sichere Identifizierung und Differenzierung von Ranaviren einschließlich der Santee-Cooper Ranaviren ermöglicht.

FORSCHUNGSAKTIVITÄTEN AM IMED

Im Rahmen eines von der EU geförderten Projektes wurden das Risiko hinsichtlich einer Verbreitung von Ranaviren und die Folgen für die Aquakultur in Europa untersucht (SSPE-CT-2005-006459: „Risk assessment of New and Emerging Systemic Iridoviral Diseases for European Fish and Aquatic Ecosystems.“).

- Empfänglichkeit europäischer Nutzfische

In Infektionsversuchen wurden die europäischen Nutzfische Wels (*Silurus glanis*), Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) und Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) auf ihre Empfänglichkeit gegenüber ausgewählten Ranaviren aus Fischen und Amphibien geprüft. Getestet wurde die Virulenz folgender Erreger: EHNV, ESV, ECV, BIV, FV 3, PPIV, SERV, Rana Esculenta Virus (REV 282/I02), Rana Tigrina Ranavirus (RTRV) sowie die Santee-Cooper Ranaviren, DFV, GV 6 und LMBV. Die Ergebnisse der Infektionsversuche bestätigten, dass Barsch und Forelle für die getesteten Ranaviren nicht empfänglich sind. Es wurden weder klinische Symptome beobachtet, noch konnten Virus oder virales Genom aus Organmaterial isoliert werden. Lediglich Welse sind für ESV sowohl bei 15 °C als 25 °C bzw. für ECV nur bei 25 °C empfänglich.

- Diagnose von Ranaviren

Ein weiterer Schwerpunkt innerhalb dieses Projektes war die Entwicklung einer diagnostischen Methode zur Identifizierung

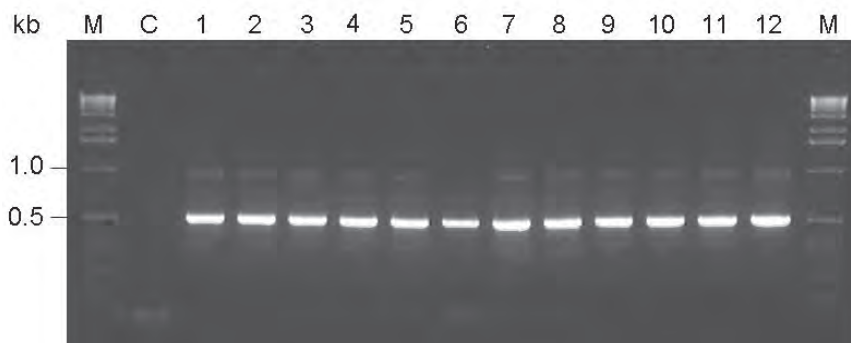


Abb. 1:
Rana MCP PCR
Die Ranaviren EHNV (1), BIV (2), ESV (3), ECV (4), PPIV (5), FV3 (6), REV (7), RTRV (8), SERV (9), GV6 (10), DFV (11) und LMBV (12) wurden nach Amplifizierung eines Teils des MCP Gens identifiziert.

rung und Differenzierung der Ranaviren, einschließlich der Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV.

Das MCP Gen der Ranaviren EHNV, ESV, ECV, PPIV, REV, SERV, FV3, BIV und RTRV wurde unter Verwendung publizierter Primer in drei einander überlappenden Fragmenten in der PCR amplifiziert. Die PCR Produkte wurden direkt bzw. nach Klonierung in den Vektor pGEM-Teasy sequenziert (Holopainen *et al.*, 2009).

Eine Amplifizierung des MCP Gens der Santee-Cooper Ranaviren war mit dieser Methode nicht möglich. Aus diesem Grund erfolgte die Identifizierung des MCP Gens des DFV nach Klonierung der Hind III bzw. Kpn I gespaltenen viralen DNA in den Vektor pUC 18. Basierend auf den ermittelten Sequenzen wurde eine PCR zur Amplifizierung des vollständigen MCP Gens der Santee-Cooper Ranaviren etabliert. Somit wurde auch das vollständige MCP Gen des DFV, GV6 und LMBV identifiziert (Ohlemeyer *et al.*, 2010).

Nach Vergleich der MCP Gensequenz der analysierten 12 Ranaviren und verfügbaren GenBank Daten wurden eine diagnostische PCR (Rana MCP PCR) etabliert (Ohlemeyer *et al.*, 2010). Diese ermöglicht eine Amplifizierung eines Teils des MCP Gens der Ranaviren einschließlich der Santee-Cooper Ranaviren (Abb. 2). Die anschließende Restriktionsanalyse des 516 Basenpaare umfassenden PCR Produktes sichert eine Differenzierung der verschiedenen Isolate.

Nach Spaltung des Rana MCP PCR Produktes mit Sal I unterscheidet sich EHNV eindeutig von anderen Ranaviren.

Eine Differenzierung der Ranaviren der Amphibien BIV, FV3, Rana Catesbeiana Virus JP (RCV-JP) und RTRV/TFV erfolgt nach Spaltung des Rana MCP PCR Produktes mit Bam H I und Aat I. Not I ermöglicht die Identifizierung von ATV/ATSV. FV3 und SSTIV aus Amphibien bzw. Reptilien weisen identische Restriktionsmuster für 268 verschiedene Endonukleasen auf. Das gesamte MCP Gen beider Erreger unterscheidet sich lediglich in fünf Nukleotidaustauschen. Zwei davon sind im amplifizierten Bereich lokalisiert. Beide Isolate lassen sich deshalb nur anhand ihres Ursprungs oder nach Sequenzanalyse des PCR Produktes differenzieren.

- Phylogenetische Verwandtschaft

Vergleiche der MCP-Nukleotidsequenzen belegen deutlich die phylogenetische Verwandtschaft der Ranavirusisolate innerhalb der Familie der Iridoviridae (Holopainen *et al.*, 2009, Ohlemeyer *et al.*, 2010).

Das MCP Gen der Ranaviren weist eine einheitliche Länge von 1392 Basenpaaren auf.

Entsprechend einem Vergleich der MCP Nukleotidsequenz ergibt sich eine Einteilung der Ranaviren in drei Gruppen (Abb. 3). Die Hauptgruppe bilden die Ranaviren der Amphibien FV3, BIV, RTRV/TFV, ATV/ATSV, RCV-JP, der Reptilien SSTIV und der Fische EHNV, ECV/ESV, PPIV, SERV und REV. Die Homologie des MCP Gens dieser Viren variiert von 100 Prozent (ESV x ECV, ATV x ATSV, RTRV x TFV) bis 93,68 Prozent (SERV x ATV/ATSV). Die Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV 6 und LMBV aus Zierfischen repräsentieren die zweite

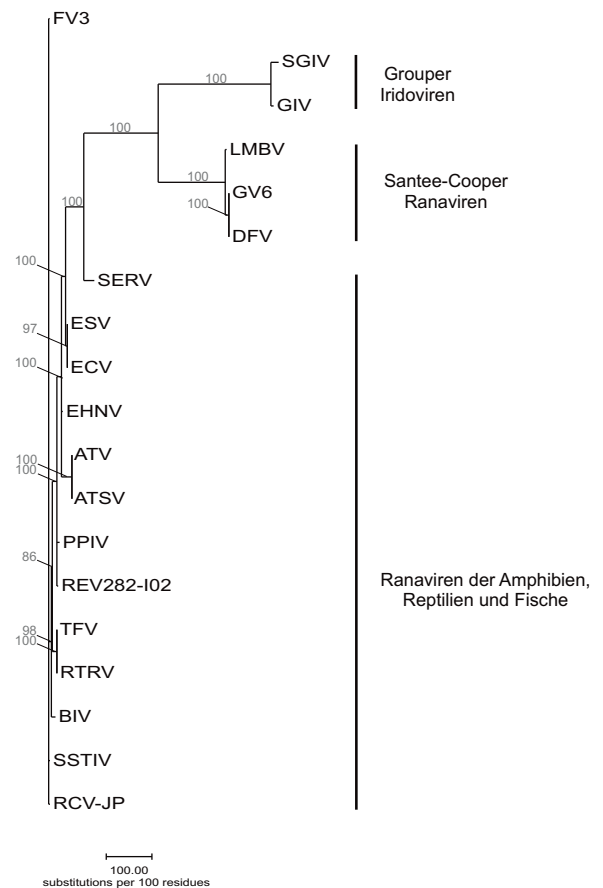


Abb. 3:

Stammbaum der Ranaviren

Die phylogenetische Analyse basiert auf der vollständigen Nukleotidsequenz des MCP Gens der Ranaviren.

Gruppe. Das MCP Gen von DFV und GV 6 ist dabei identisch. Die Homologie mit der entsprechenden Gensequenz des LMBV beträgt 99,21 Prozent. Die marinen Virusisolate GIV und SGIV sind innerhalb der MCP Gensequenz zu 98,35 Prozent homolog und stellen die dritte, deutlich abgegrenzte Gruppe innerhalb der Ranaviren dar.

ZUSAMMENFASSUNG

Ranaviren aus Amphibien und EHNV sind seit 2008 innerhalb der EU als bedeutende Tierseuchenerreger anzeigepflichtig. In Europa verursachten Ranaviren der Amphibien und die EHNV-verbundenen Erreger ESV und ECV Verluste bei Amphibien und in Aquakulturen. EHNV wurde in Europa bislang nicht nachgewiesen. Die europäischen Nutzfische Wels (*Silurus glanis*), Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) und Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) sind für die anzeigepflichtigen Ranaviren nicht empfänglich. Die Identifizierung und Differenzierung der Ranaviren ist nach Amplifizierung eines Teils des MCP Gens mit anschließender Restriktionsanalyse möglich.

LITERATUR

- FAUQUET, C.M., M.A. MAYO, J. MANILOFF, K. DESSELBERGER, AND L.A. BALL. 2005. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Virology Division International Union of Microbiological Societies, Elsevier Academic Press.
- WHITTINGTON, R.J., J.A. BECKER, AND M.M. DENNIS. 2009. Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. *J Fish Dis* 33:95-122.
- HYATT, A.D., A.R. GOULD, Z. ZUPANOVIC, A.A. CUNNINGHAM, S. HENGSTBERGER, R.J. WHITTINGTON, J. KATTENBELT, AND B.E. COUPAR. 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch Virol* 145:301-331.
- HOLOPAINEN, R., S. OHLEMEYER, H. SCHÜTZE, S.M. BERGMANN, AND H. TAPIOVAARA. 2009. Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis Aquat Org* 85:81-91.
- OHLEMEYER, S., R. HOLOPAINEN, H. TAPIOVAARA, S.M. BERGMANN, AND H. SCHÜTZE. 2010: Major capsid protein gene sequence analysis of the Santee-Cooper Ranaviruses DFV, GV6 and LMBV. *Dis Aquat Org*, submitted.

Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger (INNT)

DAS RIFT-VALLEY-FIEBER-VIRUS

Martin Eiden, Susanne Jäckel, Anne Balkema-Buschmann, Martin H. Groschup

Das „Rift-Valley-Fieber-Virus“ (RVFV) gehört zur Familie der *Bunyaviridae*, Genus *Phlebovirus* und kann schwere Erkrankungen sowohl bei Wiederkäuern (Schafe, Ziegen, Kamele, Rinder) als auch bei Menschen auslösen. Das RVFV gehört zur Gruppe zoonotischer Arboviren und wird durch verschiedene Stechmückenarten übertragen. Erstmals 1930 im ostafrikanischen Rift Valley entdeckt, verursachte es mehrere große Epidemien in ganz Afrika und breitete sich im Jahr 2000 bis nach Saudi-Arabien und Jemen aus. Das Rift-Valley-Fieber ist seit 2001 eine anzeigepflichtige Tierseuche in Deutschland.

VORKOMMEN UND ÜBERTRAGUNG

RVFV wurde erstmals 1931 in Kenia in der Nähe der Stadt Naivasha im Rift Valley entdeckt. Größere Ausbrüche mit jahrelangen interepidemischen Phasen fanden in Kenia in 1968, 1978/79, 1998 und 2006/7 statt sowie in anderen Ländern im Süden Afrikas (Süd-Afrika, Sambia, Simbabwe). Das Virus breitete sich in Afrika weiter nach Norden aus und wurde im Senegal, in Mali, Guinea, Tansania und Somalia nachgewiesen. 1977 kam es in Ägypten zu einem schweren Ausbruch mit mehr als 600 Toten. RVFV-Ausbrüche wurden dort auch in den 1990er Jahren beschrieben. Im Jahr 2000 trat das Virus erstmals außerhalb Afrikas auf der Arabischen

Land	Ausbrüche	Spezies	Verdachtsfälle	positiv	Tote
Botswana	3	Rinder	1127	21	3
		Ziegen	1689	125	95
		Schafe	306	9	5
		insgesamt	3122	155	103
Mauretanien	3	Kameliden	120	29	20
		Schafe Ziegen	550	144	1
		insgesamt	670	173	21
Namibia	12	Ziegen	378	7	7
		Schafe	7562	56	22
		Schafe/Ziegen	300	6	6
		insgesamt	8240	69	35
Saudi-Arabien	1	Rinder	1	1	0
		Schafe	100	5	0
		insgesamt	101	6	0
Südafrika	19	Schafe	20	2	2
		Büffel	146	4	4
	489	Kameliden	227	5	5
		Rinder	70445	738	448
		Ziegen	5993	157	86
		Schafe	265080	13117	8078
		Schafe/Ziegen	5163	269	204
		Wildtiere	9344	52	52
1	Schafe	45	1	1	
insgesamt			368596	14748	9039

Tabelle 1: RVFV Ausbrüche 2010 (Quelle: OIE)



Halbinsel im Jemen und in Saudi-Arabien auf. Das RVFV wurde letztmals 2010 in Mauretanien und wiederum in Saudi-Arabien nachgewiesen. In Afrika konnte 2010 bei mehr als 14.000 Tieren eine Infektion nachgewiesen werden (Tab. 1). Nach Angaben des National Institute for Communicable Diseases (NICD) erkrankten 2010 allein in Südafrika 237 Personen am RVF, davon starben 26 (Stand 1.10.2010).

Das Virus wird bei Tieren in der Regel über Stechmücken der Gattung *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* und *Eretmapotides* übertragen. Ein besonderes Charakteristikum ist die transovarielle Übertragung des Virus vor allem in *Aedes*-Arten, wodurch es zu einem jahrelangen Überleben des Erregers in eingetrockneten Stechmückeneiern während Dürreperioden kommt. Nach Überschwemmungen entwickeln sich aus den Eiern infizierte *Aedes*-Mücken, die z. B. kleine Wiederkäuer infizieren, an denen sich dann wiederum andere Stechmückenarten infizieren, so dass im Rahmen der Epidemie zunehmend auch *Culex*- gefolgt von *Anopheles*-Spezies beteiligt sind. In neuerer Zeit wird versucht, Frühwarnsysteme unter Beachtung geographischer und biologischer Risikofaktoren sowie von Klimamodellen zu entwickeln, um die epizootischen Zyklen besser vorhersagen zu können. Bei jungen Schafen und

Ziegen geht die Infektion mit einer sehr hohen Mortalität und bei trächtigen Tieren mit seuchenhaften Aborten („abortion storms“) einher. Die Inkubationszeit variiert von drei Stunden bei neugeborenen Lämmern bis zu drei Tagen bei adulten Tieren. Neugeborene Tiere zeigen eine Mortalität von nahezu 100 Prozent. Ähnliche, wenn auch nicht so schwerwiegende Krankheitsbilder werden bei Rindern, Kamelen und Büffeln beobachtet. Generell ist eine sinkende Empfänglichkeit mit steigendem Alter zu beobachten. Klinisch inapparente Infektionen wurden bei Pferden, Schweinen und Hunden beschrieben. Menschen (z. B. Tierärzte, Schlachter) können sich über den Stich infizierter Stechmücken oder durch direkten Kontakt mit infiziertem Gewebe und Aerosolen infizieren (Tab. 2). Da o. g. Stechmückenarten teilweise auch in Europa (sogar in Deutschland!) verbreitet sind bzw. sich langsam dorthin ausbreiten, kann eine Entstehung eines einheimischen Infektionszyklus für RVFV nach einer Erregereinschleppung nicht ausgeschlossen werden. Beispiele sind Arten der Gattungen *Culex* und *Aedes*, die auch in Deutschland gefunden werden (z. B. *Culex pipiens* und *Aedes vexans*). In experimentellen Studien konnten diese Arten mit RVFV infiziert und dabei eine effiziente Vermehrung im Körper nachgewiesen werden.

Hoch empfänglich	empfänglich	Moderat empfänglich	Empfänglich (Infektion inapparent)	Resistent
neugeborene Lämmer Katzen-/Hundewelpen Mäuse Hamster	Kälber adulte Schafe	Rinder (adult) Ziegen Büffel Mensch	Kamele Pferd Schwein Hund Katze Hase Meerschweinchen	Vögel Amphibien Reptilien

Tabelle 2: Empfänglichkeit verschiedener Spezies gegenüber dem Rift-Valley-Fieber-Virus (nach Gerdes *et al.*, 2004)

PATHOGENESE UND KLINIK

Das Virus gelangt über Speicheldrüsensekrete der Stechmücken in die Blutbahn und von dort in die Leber, das Haupt-Replikationsorgan. Lebernekrosen sind ein allgemeines Kennzeichen der Infektion. Weitere pathologische Merkmale sind Körperhöhlenergüsse, vergrößerte und ödematöse periphere Lymphknoten sowie eine hämorrhagische Enteritis. Neben der Leber sind bevorzugte Replikationsorgane des Virus die Milz und das Gehirn. Bei schweren Verläufen kann das Virus in allen Organen und Zelltypen gefunden werden. Beim Menschen beträgt die Inkubationszeit drei bis sieben Tage, wobei man zwischen milden, schweren bis hin zu tödlichen Verläufen unterscheidet. Während es bei milden Verläufen nach zwei bis sieben Tagen meist zu einer spontanen Erholung kommt, können bei schweren Erkrankungen eine Retinitis, hämorrhagisches Fieber und eine Meningoenzephalitis auftreten.

MOLEKULARBIOLOGIE

Wie bei anderen Vertretern des Genus *Phlebovirus* besitzen die Viruspartikel ikosaedrische Symmetrie mit einem Durchmesser von 90-110 Nanometern. RVFV besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom negativer Polarität, das in drei Segmente gegliedert ist. Das S-Segment besitzt eine Länge von rund 1,6 Kilobasenpaaren (kbp) und kodiert aufgrund seiner ambisense Polarität für das Nukleo(NP)-Protein in (-)-Orientierung und für das Nichtstruktur (NSs)-Protein in (+)-Orientierung. Das M-Segment mit einer Länge von rund 3,8 kbp kodiert in einem offenen Leserahmen (ORF) für insgesamt vier Proteine: das N-terminale Gn(G1)-Glykoprotein sowie das C-terminale Gc(G2)-Glykoprotein. Zusätzlich liegen im ORF zwei Nichtstrukturproteine, das 14-kDa NSm und das 78-kDa (NSm-Gn)-Fusionsprotein, die durch unterschiedliche Nutzung der insgesamt fünf AUG-Startkodons gebildet werden können. Das L-Segment (ca. 6.4 kbp) kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Abb. 1).

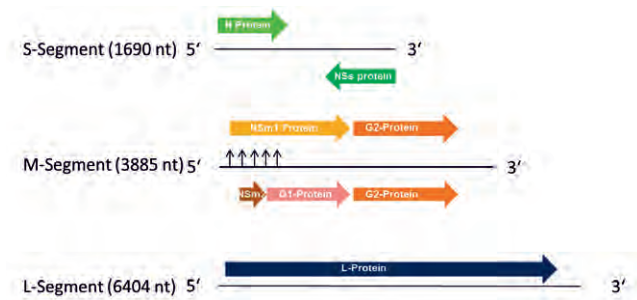


Abb. 1:
Genomstruktur des RVFV

Beide Nichtstrukturproteine stellen Virulenzfaktoren dar, die den Verlauf und die Pathogenese nach einer Infektion beeinflussen. Dabei hemmt das NSs-Protein allgemein die intrazelluläre Transkription nach der Infektion: Bereits drei bis vier Stunden nach der Infektion kommt es zu einer Inhibition der Interferon- β -Produktion durch die Bildung eines INFB β -Repressorkomplexes. Zusätzlich interagiert NSs mit dem Protein p44 und verhindert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors TFIIA und der Proteinkinase R (PKR). Das NSm-Protein hingegen hemmt die Virus-induzierte Apoptose durch Inhibition der Caspase-8-Aktivität.

Die glykosylierten Strukturproteine werden als ein Precursorprotein synthetisiert und durch eine zelluläre Protease in einen aminoterminalen (Gn bzw. G1) und einen C-terminalen Teil (Gc bzw. G2) gespalten. Das unprozessierte G1-Protein besitzt eine Masse von ca. 58 kDa, das G2-Protein eine von ca. 56 kDa. Beide Proteine bilden Heterodimere im Endoplasmatischen Retikulum, wandern in den Golgiapparat, wo nach Anlagerung der Nukleokapsidproteine und des Genoms der Buddingprozess mit der anschließenden Bildung infektiöser Partikel startet.

Die beiden Glykoproteine induzieren während der Infektion die Bildung neutralisierender Antikörper. Über sie erfolgt ferner die Rezeptorvermittelte Endozytose in verschiedene Zelltypen. Bislang konnte jedoch kein spezifischer zellulärer RVFV-Rezeptor identifiziert werden.

Die Transkription und Replikation der viralen RNA wird erst in Assoziation mit dem NP-Protein und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (L-Protein) ermöglicht, die den Ribonukleinprotein (RNP)-Komplex bilden.

Ein besonderes Merkmal des Erregers ist die sehr geringe genetische Diversität der einzelnen Isolate. Die Sequenzunterschiede liegen dabei im Bereich von ein bis vier Prozent – ganz im Gegensatz zu anderen Vertretern der Bunyaviren, wie z. B. dem Krim-Kongo-Hämorrhagischen-Fieber-Virus mit einer Variabilität von über 30 Prozent. Die Ursache hierfür könnte in einer geringen Mutationstoleranz innerhalb des Virus-Genoms liegen oder darin, dass alle Isolate von einem einzelnen Stamm abstammen.

DIAGNOSTIK

Für den Erreger-Nachweis kommen verschiedene Methoden zur Anwendung, darunter die Virusanzucht in Hamster- (BHK-), Meerkatzen- (Vero-) und embryonalen Hühnerzellen. Antikörpernachweise können mittels Hämagglutinations- und Immundiffusions (ID)-Tests sowie Plaquereduktions-Neutralisationstests durchgeführt werden. Diese Untersuchungen erfordern jedoch spezialisierte Labore für die Arbeit unter S3-Bedingungen.

Für den diagnostischen Nachweis der viralen RNA werden verschiedene RT-PCR-Assays verwendet. Neuere Taqman-basierte quantitative *real-time* RT-PCR Assays nutzen dabei als Target-Region Sequenzabschnitte auf dem L- bzw. M-Segment. Daneben kommt auch eine Loop Mediated Isothermal Amplification Assay (RT-LAMP) zum Einsatz. Im Gegensatz zu konventionellen PCR-Assays erfolgt die Amplifikation bei der RT-LAMP bei einer konstanten Temperatur, weshalb diese unter Feldbedingungen in Epidemiegebieten in Afrika sehr gut einsetzbar ist (geringere Kosten, geringer gerätetechnischer und infrastruktureller Aufwand). Aufgrund der kurzen Virämiephase von meist nur ca. fünf Tagen und oftmals nur subklinischen Verläufen ist die Durchführung serologischer Untersuchungen unerlässlich. IgM- gefolgt von IgG-Antikörpern können bereits nach vier bis acht Tagen bzw. ein bis zwei Wochen detektiert werden (Abb. 2). IgM-Antikörper können dabei noch bis zu fünf Monate nach der Infektion nachgewiesen werden.

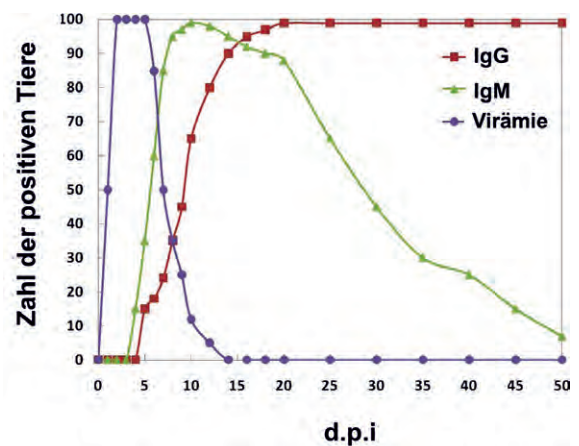


Abb. 2:
IgG und IgM-Bildung nach RVFV-Infektion (Bouloy & Weber, 2010)

Grundsätzlich stehen kommerzielle ELISA-Systeme von den Firmen BDSL (Großbritannien) und IDvet (Frankreich) zur Verfügung. Damit können IgM-Antikörper (BDSL, capture IgM), IgG (BDSL, recN indirect IgG ELISA) oder beide Antikörperklassen (IDvet competition ELISA, BDSL inhibition ELISA) nachgewiesen werden. Zwei weitere ELISA-Prototypen aus dem Onderstepoort Veterinary Institute (OVI) in Südafrika (OVI IgG-, IgM-ELISA) werden zur Zeit im Rahmen eines

Ringversuchs, an dem auch das INNT beteiligt ist, getestet. Die Assays beruhen vor allem auf dem Nachweis von Antikörpern gegen das NP-Protein. Derzeit stehen noch keine ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen die immunogenen Glykoproteine G1/G2 zur Verfügung.

Eine weitere Möglichkeit, Antikörper im Serum nachzuweisen bietet sich mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) der Firma Euroimmun an. Das Testsystem wird im Augenblick jedoch nur für den Nachweis von humanen Antikörpern verwendet.

THERAPIE

Bislang lassen sich RVFV-Infektionen nur symptomatisch behandeln. In tierexperimentellen Studien mit RVFV-infizierten Mäusen, Ratten und Affen konnte gezeigt werden, dass Ribavirin gegen die Infektion unter bestimmten Umständen schützen kann. Anekdotische Berichte über Behandlungsversuche mit Ribavirin beim Menschen sind wissenschaftlich nicht dokumentiert; demnach war die Ribavirin-Anwendung z. B. in Saudi-Arabien nicht erfolgreich.

IMPf-PROPHYLAXE

In betroffenen afrikanischen Ländern und in Saudi-Arabien wurden bei Tieren sowohl inaktivierte Totimpfstoffe als auch attenuierte Lebendimpfstoffe verwendet.

Zwei Formalin-inaktivierte Vakzinen basieren auf einem Isolat aus Uganda (Entebbe-Stamm) nach Passage in Affennierenzellen (Vakzine NDBR 103) oder Affen-Lungenzellen (Vakzine TSI-GSD 200). Diese Impfstoffe wurden sogar beim Menschen eingesetzt, ohne dass schwerwiegendere Nebenwirkungen auftraten (i. d. R. nur lokale Rötungen und Schwellungen an der Einstichstelle). Allerdings war der Impfschutz nur kurz (unter 300 Tage) und regelmäßige Wiederholungsimpfungen waren erforderlich.

Deshalb wurden attenuierte Lebendimpfstoffe entwickelt, die in der Regel eine jahrelange Immunität vermitteln. Der anfangs verwendete Smithburn-Stamm, der über mehr als 100 Passagen in Mäusehirn attenuiert wurde, stammte aus einem Mückenisolat aus Uganda (Vakzine MLV). Allerdings besitzt dieses Virus nach wie vor noch erhebliche neurotrope und teratogene Effekte. Aus dem Stamm ZH548 wurde schließlich nach mehreren Zellpassagen in Anwesenheit des Mutagens 5-Fluorouracil (5FU) der sog. MP12-Stamm gewonnen, so dass er in allen drei Genom-Segmenten Mutationen besitzt. Obschon die Verwendung von MP12 ein vielversprechender Ansatz ist und bereits Impfstudien an Menschen durchgeführt wurden (derzeit befindet er sich in der Phase II Entwicklung), muss festgestellt werden, dass er bei trächtigen Schafen und Hamstern immer noch abortive und neurovirulente Effekte besitzt.

Bislang keine Nebeneffekte wurden beim Plaque-Isolat (Clone 13) des RVFV-Stammes 75HB59 beobachtet, der eine Deletion im Bereich des NSs-Gens besitzt. Clone 13 wurde in Südafrika inzwischen als kommerzieller Impfstoff zugelassen.

Außerdem wurde durch Doppelinfektionen eine natürliche Reassortante zwischen MP12 und Clone 13 hergestellt (R566), die aus dem S-Segment von Clone 13 sowie den M und L-Segmenten von MP12 besteht.

Des Weiteren sind eine Reihe gentechnischer Impfstoffe beschrieben, deren Eignung und Verwendung in der Praxis jedoch bisher noch nicht absehbar ist. Hierzu gehören sogenannte nicht replikationsfähige „Virus-like particles“ (VLPs) aus den beiden Glykoproteinen G1 und G2 sowie dem NP-Protein des RVFV, DNA-Impfstoffe auf der Basis von Plasmiden für diese Proteine sowie chimäre Viren auf der Basis von diese Proteine exprimierenden Paramyxoviren (NDV) oder Pockenviren (Lumpy Skin Disease-Virus aus der Gattung Schafpocken).

UNTERSUCHUNGEN AM INNT

Bisher konnten noch keine Arbeiten mit infektiösem RVFV durchgeführt werden, da die notwendigen Laborkapazitäten für diesen L3-Erreger am FLI derzeit nicht zur Verfügung stehen. Der Schwerpunkt lag daher auf der Etablierung der molekularen und serologischen Diagnostik. Hierzu wurden alle Strukturproteine sowie das NP-Protein bakteriell in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt.

Der diagnostische Nachweis mittels PCR konnte mit drei unterschiedlichen Virus-Stämmen durchgeführt werden: einem ägyptischen Isolat (ZH548) und zwei attenuierten Stämmen (Clone 13 und MP12). Verwendet wurden zwei quantitative *real-Time* RT-PCR-Protokolle mit Fluoreszenz (FAM)-markierten Taqman-Sonden.

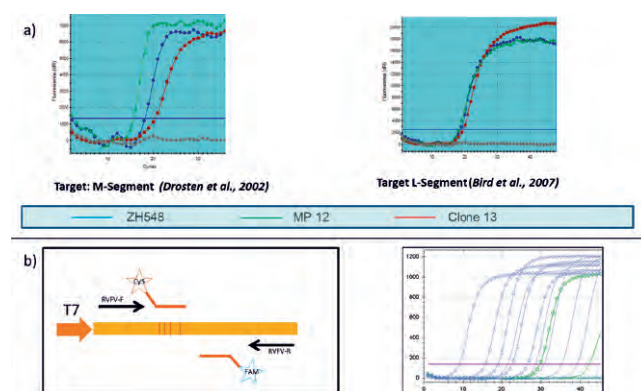


Abb. 3: Quantitative real-time RT-PCR von RVFV
a) Quantitative real-time RT-PCR
b) Synthetische RNA-Kontrolle

Die Targetregion lag bei Assay 1 (Drosten *et al.*, 2002) auf dem M-Segment und bei Assay 2 (Bird *et al.*, 2007) auf dem L-Segment. Mit beiden Assays konnten die drei Stämme nachgewiesen werden (Abb. 3a). Zusätzlich wurde eine synthetische RNA-Kontrolle für Assay 2 eingesetzt (Abb. 3b), mit der die Bestimmung der Kopienzahl möglich ist. Aufgrund gezielter Austausche von Guanin/Cytosin-Nukleotiden kann die Kontroll-RNA von der viralen RNA unterschieden und selektiv mit Hilfe einer Cy5-markierten Taqman-Sonde detektiert werden.

Als serologische Nachweismethoden wurden kommerzielle ELISAs eingesetzt bzw. neue ELISAs auf der Basis rekombinanter G1/G2-Proteine etabliert. Derzeit läuft zusammen mit europäischen Kooperationspartnern aus dem Epizone-Verband (Network of Excellence for Epizootic Disease Diagnosis and Control) eine Validierung dieser ELISAs. Die Generierung rekombinanter Proteine des RVFV erfolgte in einem bakteriellen Expressionssystem, wobei den beiden Strukturproteinen jeweils die Transmembrandomäne entfernt wurde (Δ G1, Δ G2), um deren Löslichkeit zu erhöhen (Abb. 4).

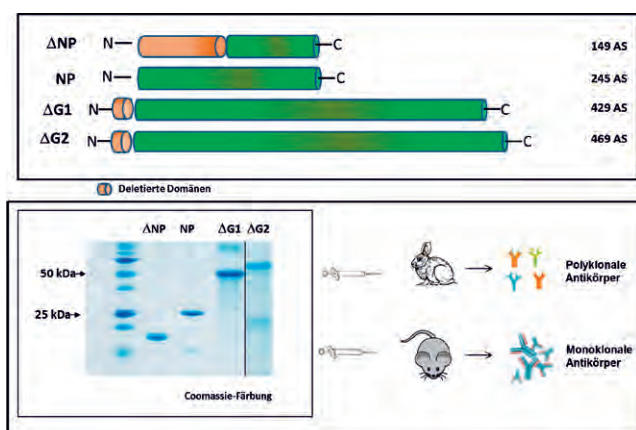


Abb. 4:
Rekombinante Proteine des RVFV

Auch vom Nukleokapsid-Protein wurde eine N-terminale Deletionsmutante hergestellt (Δ NP). Zur Gewinnung ausreichender Proteinmengen im Milligramm-Bereich wurden verschiedene Aufreinigungsprotokolle verglichen und geeignete Verfahren optimiert. Gegen diese gereinigten rekombinanten Proteine wurden schließlich polyklonale Antiseren in Kaninchen hergestellt (Abb. 4). In Zusammenarbeit mit Dr. Dauber (Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit, ATB) wurden zudem monoklonale Antikörper hergestellt. Mit Hilfe dieser Antikörper sollen weitere ELISA-Systeme (kompetitiver ELISA; Sandwich ELISA) aufgebaut und der immunhistochemische (IHC) und indirekte Immunfluoreszenz (IFA)-Nachweis des RVFV etabliert werden. Die Verfügbarkeit geeigneten Probenmaterials (Seren und Gewebeproben) von infizierten bzw. rekonvaleszenten

Tieren stellt eine große Schwierigkeit bei der Bearbeitung dieser für Europa exotischen Viruserkrankung dar. Um die Nachweisverfahren zu validieren, werden deshalb Kooperationen mit europäischen wie auch mit afrikanischen Partnern aufgebaut, um Zugang zu solchen Proben zu erhalten. In diesem Zusammenhang ist deshalb eine Infektionsstudie an kleinen Wiederkäuern unter L3-Bedingungen zusammen mit den europäischen Kooperationspartnern innerhalb des NADIR-Projekts (The Network of Animal Disease Infectiology Research Facilities) geplant.

LITERATUR

- BOULOUY, M. AND F. WEBER. 2010. Molecular biology of rift valley fever virus. *Open Virol J* 4:8-14.
- GERDES, G.H. 2004. Rift valley fever virus. *Rev sci tech Off int Epiz* 23(2):613-623
- BIRD, B.H., D.A. BAWIEC, T.G. KSIAZEK, T.R. SHOEMAKER, AND S.T. NICHOL. 2007. Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus. *J Clin Microbiol* 45(11):3506-13.
- DROSTEN, C., S. GÖTTIG, S. SCHILLING, M. ASPER, M. PANNING, H. SCHMITZ, AND S. GÜNTHER. 2002. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 40(7):2323-30.
- IKEGAMI, T. AND S. MAKINO. Rift Valley fever vaccines. *Vaccine* 27:D69-D72

Institut für Tierernährung (ITE)

KONJUGIERTE LINOLSÄUREN (CLA) IN DER MILCHVIEHERNÄHRUNG

Julia Pappritz, Lydia Renner, Dirk von Soosten, Ulrich Meyer, Sven Dänicke

Das natürliche Vorkommen der konjugierten Linolsäuren (CLA) beschränkt sich in erster Linie auf Wiederkäuerprodukte wie Fleisch und Milch, da die Mikroben im Pansen der Wiederkäuer in der Lage sind, CLA zu bilden. Beim Abbau der 18 C-Atome enthaltenden 2-fach ungesättigten Fettsäure Linolsäure (C18:2) entstehen diese als Zwischenprodukte der Biohydrogenierung. Bei den konjugierten Linolsäuren handelt es sich um Fettsäuren mit gleicher Summenformel aber unterschiedlicher Konfiguration. Anders als bei der Linolsäure enthalten diese Fettsäuren konjugierte Doppelbindungen, d. h. Doppelbindungen, die nicht durch eine isolierende Methylengruppe voneinander getrennt sind. Die im Pansen gebildeten CLA werden in den Geweben der Milchkuh angereichert und/oder beeinflussen aufgrund ihrer spezifischen räumlichen Struktur bestimmte Prozesse des Intermediärstoffwechsels. Die bedeutendsten dieser sogenannten Isomere sind die *cis*-9, *trans*-11 CLA und die *trans*-10, *cis*-12 CLA (Abb. 1). Während die *cis*-9, *trans*-11 CLA das Hauptisomer im Pansen darstellt und so auch hauptsächlich in verschiedene Gewebe und die Milch transferiert wird, konnte für das quantitativ weniger bedeutende *trans*-10, *cis*-12 Isomer eine reduzierende Wirkung auf den Milchfettgehalt nachgewiesen werden.

Die stetig steigenden Leistungen in der Milchviehhaltung bedingen eine immer höhere Energieabgabe über die Milch. Dies führt gerade in der Frühlaktation durch eine unzureichende Energieaufnahme mit dem Futter zu Stoffwechselproblemen, welche die Tiergesundheit nachteilig beeinflussen können. Vom Einsatz konjugierter Linolsäuren in der Milchkuhfütterung erhofft man sich eine Senkung der täglich produzierten Milchfettmenge und damit eine Verringerung der Energieabgabe über die Milch. Der Energiehaushalt der Milchkuh soll auf diesem Wege entlastet werden, um mögliche negative Auswirkungen eines Energiemangels auf die Tiergesundheit zu vermeiden. In Fütterungsversuchen konnte infolge einer CLA-Zulage anhand der erfassten Leistungsparameter keine eindeutige energetische Entlastung der Hochleistungskuh gezeigt werden, da oft gleichzeitig eine erhöhte Milchleistung beobachtet werden konnte. Neben der Senkung des Milchfettgehaltes konnten bei Untersuchungen mit Nagern auch dramatische Auswirkungen des *trans*-10, *cis*-12 Isomers auf den Fettstoffwechsel in Leber und Depotfetten als weitere Orte der Fettsäuresynthese nachgewiesen werden, welche sich in der Reduzierung der Körperfettdepots und einer Leberverfettung manifestierten. Weiterhin denkbar wäre eine Anreicherung einzelner Iso-

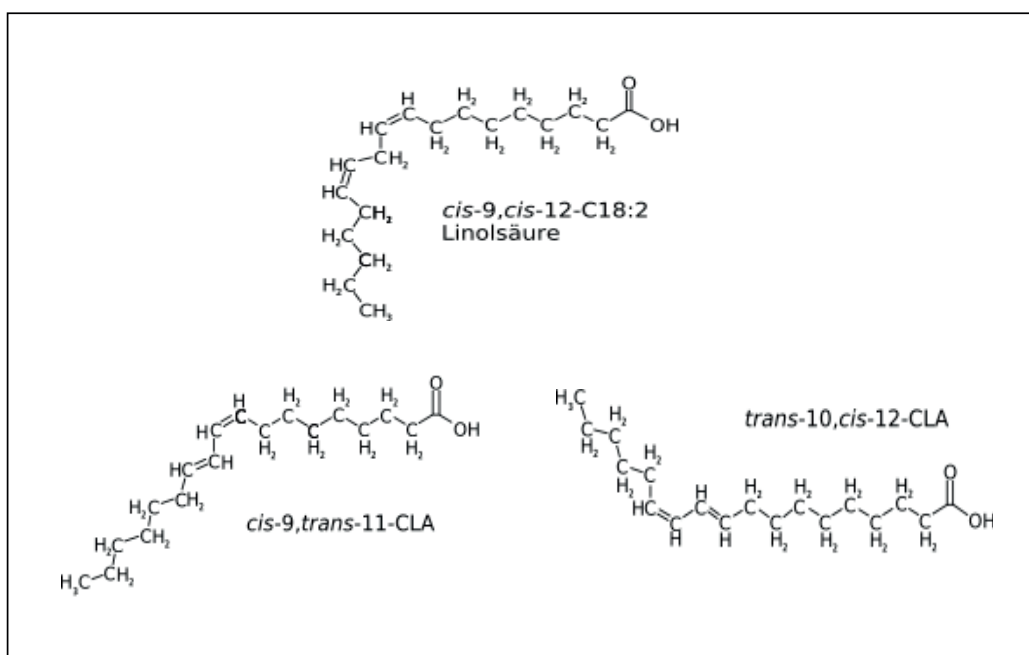


Abb 1:
Strukturformeln der Linolsäure und ihrer wichtigsten CLA-Isomere

mere im Muskel und in der Milch, für die beim Menschen positive gesundheitliche Wirkungen postuliert werden. So gibt es in der Literatur Hinweise auf eine antikanzerogene, immunmodulierende, antidiabetogene und antiatherogene Wirksamkeit einzelner CLA-Isomere. Nach derzeitigem Kenntnisstand liegt die mittlere tägliche CLA-Aufnahme des Menschen bei rund 0,3 Gramm pro Tag und erfolgt in erster Linie über Milch, Milchprodukte und Wiederkäuerfleisch. Zum Einsatz kommen in der Milchkuhfütterung vor allem CLA-Gemische, die produktionsbedingt zu gleichen Teilen die Isomere *trans*-10, *cis*-12 und *cis*-9, *trans*-11 enthalten. CLA stellen im Pansen nicht nur ein Zwischenprodukt dar, sondern fungieren außerdem als Substrat für bestimmte Pansenmikroben. Um den Abbau der CLA im Vormagensystem des Wiederkäuers und eine Beeinflussung des Pansenstoffwechsels zu verhindern, werden die Supplemente in pansengeschützter Form eingesetzt. Doch Untersuchungen weisen darauf hin, dass trotz des Schutzes ein großer Anteil der supplementierten CLA im Pansen umgesetzt wird. Noch ist ungeklärt, ob und inwieweit mikrobielle Stoffwechselfparameter dadurch beeinflusst werden.

Studien mit verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass CLA immunmodulierend wirken können. So wird nach CLA-Supplementation über einen Einfluss auf die Proliferation und Aktivierung von Lymphozyten oder die Sekretion bzw. Expression von Zytokinen berichtet. Die Wirkung von CLA auf das Immunsystem von Milchkühen wurde bisher nicht untersucht, *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen haben aber gezeigt, dass dieses durchaus über bestimmte Fettsäuren beeinflussbar ist.

Die doch erheblichen Einflüsse der CLA, die an unterschiedlichen Tierspezies beobachtet werden konnten, und die fehlenden Kenntnisse über den Einsatz der CLA in der Milchkuhfütterung waren Anlass am Institut für Tierernährung des FLI eine Reihe von Fütterungsversuchen zu dieser Problematik durchzuführen. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Erfassung von Variablen, welche Aussagen zum Einfluss der CLA-Fütterung auf den Vormagenstoffwechsel, den Energiehaushalt, die Körperfettdepots und das Immunsystem zulassen.

EINFLUSS DER CLA AUF DEN VORMAGENSTOFFWECHSEL

In ausgeprägten Phasen der negativen Energiebilanz ist der Einsatz von Fetten in der praktischen Wiederkäuerfütterung möglich. Fette weisen eine hohe Energiedichte auf und können so zu einer Verbesserung der Energieaufnahme beitragen. Für mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA), zu denen auch die CLA zählen, wurden allerdings abhängig von der eingesetzten Menge auch negative Effekte auf der Ebene des mikrobiellen Vormagenstoffwechsels beschrieben. Möglich ist die Abnahme der Faserverdauung durch

die Hemmung des mikrobiellen Wachstums und eine daraus resultierende Verminderung der Produktion an kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), was wiederum die Tiergesundheit negativ beeinflussen kann.

Um mögliche Effekte der CLA auf die Umsetzung pansenstabiler CLA in den Vormägen sowie den Einfluss der CLA auf die ruminalen mikrobiellen Nährstoffumsetzungen zu untersuchen, wurde eine Studie mit sechs ruminal und duodenal fistulierten Milchkühen durchgeführt. Die Tiere erhielten in aufeinanderfolgenden Versuchsperioden ein Kontrollfettpräparat und zwei Dosierungen eines CLA-Präparates (3 bzw. 8 g *trans*-10, *cis*-12 CLA/d). In Folge der CLA-Zulage wurde die SCFA-Konzentration im Pansen nicht beeinflusst, jedoch veränderten sich, wenn auch nur geringfügig, die molaren Anteile der einzelnen Fettsäuren. Die Ammoniakkonzentration und der pH-Wert im Pansen blieben von der CLA-Supplementation unbeeinflusst. Mit Ausnahme der Stärke konnte auch bezüglich der Nährstoffflüsse am proximalen Duodenum kein Effekt durch CLA nachgewiesen werden. Der verringerte Fluss an Stärke lässt auf eine bessere scheinbare ruminale Verdaulichkeit der Stärke schließen. Eine geringere Effizienz der Mikrobenproteinsynthese sowie ein erhöhter Abbau des aufgenommenen Proteins im Pansen sprechen weiterhin für Veränderungen im Pansen infolge einer Zulage von pansengeschützten CLA zum Futter.

FETTSÄURENVERTEILUNG IM MILCHFETT NACH CLA-ZULAGE

Das Milchfett zeichnet sich durch seine Vielzahl und eine breite Verteilung von Fettsäuren aus. Die Milchfettsäuren mit weniger als 16 C-Atomen werden von der Milchdrüse selbst gebildet. Fettsäuren mit mehr als 16 C-Atomen werden aus dem Blut aufgenommen und stammen aus Nahrungsfetten oder wurden durch die Mobilisierung von Körperfett freigesetzt. Die C16-Fettsäuren hingegen werden etwa zur Hälfte neu gebildet und zur anderen Hälfte aus dem Blut resorbiert. Die Verteilung der Fettsäuren im Milchfett ist durch die Fütterung beeinflussbar. Futtermittel, die reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind, führen zu einem Anstieg des Anteils dieser Fettsäuren im Milchfett. Auch der Anteil der supplementierten *trans*-10, *cis*-12 und *cis*-9, *trans*-11 CLA erhöhte sich dosisabhängig im Milchfett. Das *cis*-9, *trans*-11 Isomer bildet dabei nach wie vor das Hauptisomer in der Milch, während der Anteil der *trans*-10, *cis*-12 CLA vernachlässigbar gering ist. Anhand des Transfers dieses Isomers in die Milch werden in der Literatur Aussagen zum Grad des Schutzes des verabreichten Supplements abgeleitet, da zahlreiche Infusionsstudien einen relativ konstanten proportionalen Übergang des Isomers (etwa 20 Prozent) zeigen konnten. Unterstellt man diesem Transfer einen Schutz von 100 Prozent, so kommen in den eigenen Untersuchungen nur etwa 27 Prozent des eingesetzten Präparates wirklich am Duodenum an.

CLA-WIRKUNGEN AUF DEN ENERGIEHAUSHALT

Der Energiehaushalt der Milchkuh kann vereinfacht als die Verwendung der über das Futter aufgenommenen Energie für Erhaltung und Leistung beschrieben werden. Mittels der Versuchstechnik im Boxenlaufstall des Instituts für Tierernährung war es möglich, durch die Erfassung der täglichen tierindividuellen Futteraufnahme und Milchmenge sowie über externe Bestimmung der Futter- und Milchhaltsstoffe Fragen zum Energiehaushalt der Milchkuh zu untersuchen. Die eingangs beschriebene Frage, ob die CLA-bedingte Milchfettsenkung gleichzeitig zu einer Verringerung der Energieausscheidung über die Milch führt, wurde in zwei Versuchen untersucht.

Der Schwerpunkt des ersten Versuches lag in der Erfassung dosisabhängiger Langzeiteffekte über eine Supplementationsphase von 182 Laktationstagen direkt nach der Abkalbung. Außerdem wurde ein Depletionszeitraum von 12 Wochen betrachtet. Sechszwanzig Tiere wurden auf drei Fütterungsgruppen aufgeteilt und erhielten ein Kontrollfettsupplement, vier Gramm trans-10, cis-12 CLA (CLA-1) oder acht Gramm trans-10, cis-12 CLA (CLA-2). Ein Energiespareffekt von ein bzw. zwei Megajoule (MJ) trat nur bei der höchsten Dosierung auf. Dieser war nur sehr gering, da der

Fettgehalt der Milch mit den eingesetzten CLA-Mengen nur geringfügig gesenkt werden konnte und gleichzeitig eine erhöhte Milchmenge auftrat (Tab. 1).

In einem zweiten Versuch mit erstlaktierenden Milchkuhen wurden 20 Tiere nach der Abkalbung einer Kontroll- und CLA-Fütterungsgruppe zugeteilt. Die Tiere der CLA-Gruppe konsumierten täglich 6 Gramm des trans-10, cis-12 CLA-Isomers und 6 Gramm des cis-9, trans-11 CLA-Isomers. Der Versuch erstreckte sich bis zum 105. Laktationstag. Aufgrund von Versuchsschlachtungen am 42. Laktationstag waren ab diesem Zeitpunkt nur noch fünf Tiere in jeder Gruppe vorhanden. Die Daten in Tabelle 2 zeigen, dass durch eine CLA-Gabe die Fettleistung zwar deutlich sinkt, aber gleichzeitig etwas mehr Protein und Laktose produziert wird. Dies mindert den Energiespareffekt auf rund drei bis fünf Megajoule pro Tag. Weiterhin wurden im diesem Versuch Fragen zu CLA-Wirkungen auf Leber und Körperfettdepots untersucht. Die Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt gezeigt.

	7. – 49. Laktationstag		50. – 182. Laktationstag		183. – 266. Laktationstag	
	CLA 1	CLA 2	CLA 1	CLA 2	CLA 1	CLA 2
Milchleistung (kg)	+ 2,0	+ 0,6	+ 4,0	+ 2,8	+ 1,3	+ 0,5
Fettleistung (g)	+ 110	- 50	+ 70	- 40	+ 80	+ 50
Proteinleistung (g)	+ 60	+ 20	+ 100	+ 40	+ 40	+ 10
Laktoseleistung (g)	+ 100	+ 30	+ 190	+ 140	+ 60	+ 20
Energetische Bewertung ¹ (MJ)						
Minderbedarf Fett	- 4,4	2,0	- 2,8	1,6	- 3,1	- 2,0
Mehrbedarf Protein	1,4	0,5	2,4	1,0	1,0	0,2
Mehrbedarf Laktose	1,7	0,5	3,2	2,4	1,0	0,3
Energiespareffekt ²	-7,5	1,0	- 8,5	1,8	- 5,1	- 2,5

¹ Der energetische Minder- oder Mehrbedarf (Nettomenge je Tag) wurde aus den Veränderungen der Fett-, Protein- und Laktoseleistung berechnet. Je g Milchhaltsstoff wurden folgende Energiegehalte unterstellt: Fett 39,7 KJ/g; Protein 23,9 KJ/g; Laktose 17 KJ/g.

² Minderbedarf Fett (MJ) – (Mehrbedarf Protein (MJ) + Mehrbedarf Laktose (MJ)).

Tabelle 1: Veränderungen in den täglich produzierten Mengen der Milchhaltsstoffe und energetische Bewertung dieser Veränderungen bei zwei unterschiedlichen CLA-Dosierungen gegenüber einer Kontrollgruppe bis zum 266. Laktationstag (Versuch 1)

	1. – 42. Laktationstag (n=10)		42. – 105. Laktationstag (n=5)	
	%	je Tag	%	je Tag
Milchleistung	+ 4,7	1,1 kg	+ 10,4	2,7 kg
Fettleistung	- 9,8	- 100 g	- 17,4	- 180 g
Proteinleistung	+ 1,3	+ 10 g	+ 0	+ 0 g
Laktoseleistung	+ 5,3	+ 60 g	+ 9,5	+ 120 g
Energetische Bewertung ¹ (MJ)				
Minderbedarf Fett		4,0		7,1
Mehrbedarf Protein		0,2		0,0
Mehrbedarf Laktose		1,0		2,0
Energiespareffekt ²		2,8		5,1

¹ Der energetische Minder- oder Mehrbedarf (Nettomenge je Tag) wurde aus den Veränderungen der Fett-, Protein- und Laktoseleistung berechnet. Je g Milchinhaltstoff wurden folgende Energiegehalte unterstellt: Fett 39,7 KJ/g; Protein 23,9 KJ/g; Laktose 17 KJ/g.

² Minderbedarf Fett (MJ) – (Mehrbedarf Protein (MJ) + Mehrbedarf Laktose (MJ)).

Tab. 2: Veränderungen in den täglich produzierten Mengen der Milchinhaltstoffe und energetische Bewertung dieser Veränderungen bei CLA-Fütterung gegenüber einer Kontrollgruppe in den ersten 105 Laktationstagen (Versuch 2)

CLA-WIRKUNGEN AUF LEBER UND KÖRPERFETTDEPOTS

Bei Mäusen führte die Verabreichung von CLA-Präparaten zu Leberverfettung und dramatischer Reduktion von verschiedenen Körperfettdepots. Diese Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel konnten hauptsächlich dem *trans*-10, *cis*-12 CLA-Isomer zugeordnet werden. Die Milchfett-reduzierende Wirkung bei der Milchkuh dieses Isomers ist in mehreren Studien belegt. Untersuchungen zu Wirkungen auf die Leber- und Körperfettdepotgewichte bei der Milchkuh sind jedoch noch nicht durchgeführt worden. Zudem findet die Fettsäuresynthese bei den Spezies Rind und Maus in der Leber und den Körperfettdepots in unterschiedlichem Umfang statt. Weiterhin sind bei der Milchkuh aufgrund der ruminalen Fermentation für die Fettsäuresynthese andere Quellen des Kohlenstoffs, wie beispielsweise Acetat, verfügbar. Auch die zugefütterten CLA-Mengen, bezogen auf die gesamte tägliche Trockenmasseaufnahme, sind deutlich

geringer, um eine Milchfettsenkung zu erzielen. Die Effekte der CLA-Supplementation auf Leber und Fettdepots bei Versuchsnagern sind damit nicht ohne weiteres auf die Milchkuh übertragbar.

Daher wurde ein Schlachtversuch mit 25 erstlaktierenden Milchkuhen durchgeführt, um diese Fragestellungen bezüglich der Leber und den Körperfettdepots zu untersuchen. Die Tiere wurden auf fünf Gruppen zu je fünf Tieren aufgeteilt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Abkalbung geschlachtet. Eine Basisgruppe wurde direkt nach der Abkalbung geschlachtet und erhielt kein CLA. Zwei weitere Gruppen wurden 42 Tage nach der Abkalbung geschlachtet, wobei einer dieser Gruppen CLA zugefüttert wurde und die andere Gruppe als Kontrollgruppe diente. Die restlichen zwei Gruppen wurden 105 Tage nach der Abkalbung geschlachtet und eine Gruppe erhielt CLA und die andere diente als Kontrolle. Das CLA-Präparat wurde in das Kraftfutter eingemischt und den Tieren über eine Abrufstation zugeteilt. Bei den Kontrolltieren wurde ein Kontrollfettpräparat in gleicher Menge verabreicht, in welchem die CLA durch Stearinsäure ersetzt waren. Die Tiere der CLA-Gruppen konsumierten täglich sechs Gramm des *trans*-10, *cis*-12 CLA-Isomers und sechs Gramm des *cis*-9, *trans*-11 CLA-Isomers.

Im Verlauf des Schlachtprozesses wurden die Massen der Organe sowie des retroperitonealen, omentalen, mesenterialen und subkutanen Fettdepots und aller weiteren anfallenden Teile des Tieres bestimmt. Durch Addition der Massen dieser Teile wurde die Leerkörpermasse (Masse des Tieres ohne Inhalt des Verdauungstraktes sowie der Harn- und Gallenblase) ermittelt. Die Ergebnisse zur Lebermasse und die Massen der Körperfettdepots sind als prozentualer Anteil der Leerkörpermasse in Abbildung 2 dargestellt.

Ein Anstieg des Lebermasseanteils der Leerkörpermasse ist im Vergleich zur Basisgruppe innerhalb der ersten 42 Laktationstage zu erkennen. Dieser setzt sich bis zum 105. Laktationstag fort. Zwischen den CLA- und Kontrollgruppen zu den jeweiligen Schlachtzeitpunkten gibt es jedoch keinen Unterschied. Gleichzeitig nimmt im Zeitraum der ersten 42 Laktationstage der Anteil des retroperitonealen Fettdepots an der Leerkörpermasse ab, wobei dieser Rückgang mit 41,5 Prozent in der Kontrollgruppe signifikant und mit 27,2 Prozent in der CLA-Gruppe schwächer ist. Fortgesetzt bis zum 105. Laktationstag ist der Rückgang zwischen der CLA- und Kontrollgruppe nicht unterschiedlich. Die weiterhin erfassten Fettdepots (omental, mesenterial und subkutan) zeigen zwar eine numerische Abnahme in ihrem Anteil an der Leerkörpermasse, blieben jedoch von der CLA-Fütterung weitgehend unbeeinflusst. Leberverfettung und dramatische Reduzierung der Körperfettdepots vergleichbar mit den Ergebnissen von Untersuchungen an mit CLA supplementierten Mäusen konnten nicht gezeigt werden. Der Mobilisierung der Körperfettdepots und damit der Abnahme ihrer Massen in den ersten 105 Laktationstagen steht also

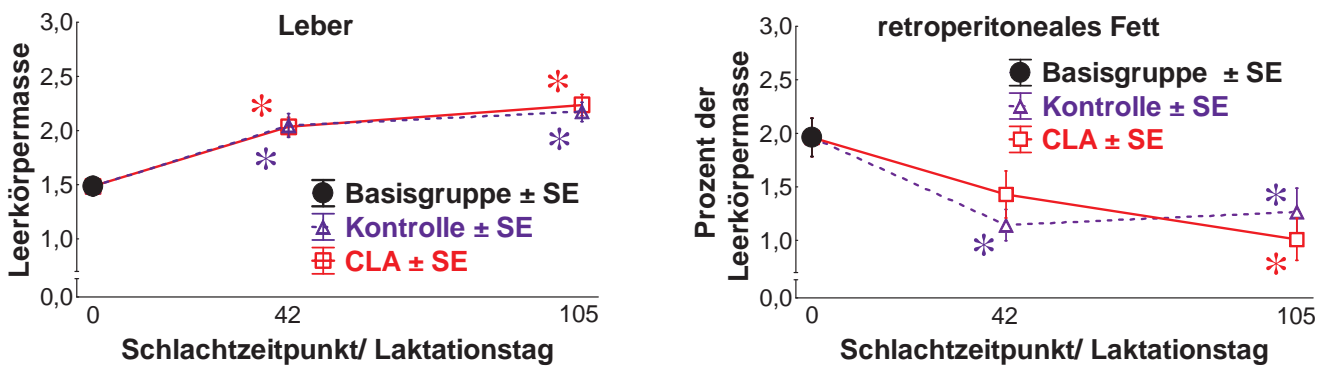


Abb 2: Massen der Leber und des retroperitonealen Fettdepots bezogen auf die Leerkörpermasse bei Milchkühen zu verschiedenen Schlachtzeitpunkten mit und ohne CLA-Fütterung. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert ± Standardfehler der fünf Tiere der jeweiligen Gruppe dar. Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) zur Basisgruppe sind mit (*) gekennzeichnet.

ein Anstieg der Lebermasse gegenüber. Diese Vorgänge in der Früh-laktation sind physiologisch bedingt und werden durch CLA nicht verstärkt. Vielmehr ist die in den ersten 42 Laktationstagen durch CLA verringerte Mobilisierung des retroperitonealen Fettdepots als positiv für die Milchkuh zu bewerten. Bei zu starkem Abbau der Körperfettreserven in der Früh-laktation entsteht aus der β -Oxidation der Fettsäuren vermehrt Acetyl-CoA, welches nicht mehr im gleichen Umfang in den Citratzyklus eingeschleust wird. Der Grund dafür liegt in einem Mangel an Oxalacetat, welches auch für die in diesem Laktationsstadium intensive Gluconeogenese in der Leber benötigt wird. Das überschüssige Acetyl-CoA kann dadurch nicht mehr zur Energiegewinnung genutzt werden. Es wird zu Ketonkörpern abgebaut, die die Futteraufnahme hemmen und die Energiemangelsituation der früh-laktierenden Milchkuh weiter verschärfen. Die CLA-bedingte reduzierte Mobilisierung des retroperitonealen Fettdepots könnte die Oxalacetatverfügbarkeit für die Gluconeogenese positiv verbessern und eine höhere Glucose-synthese möglich machen. Dafür spricht auch die etwas höhere Menge an synthetisierter Laktose in den CLA-Gruppen zu Beginn der Laktation in den beiden Versuchen (Tabelle 1 u. 2).

CLA-WIRKUNGEN AUF DAS IMMUNSYSTEM

Der Effekt einer CLA-Supplementation auf das Immunsystem wurde mittels peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) und Splenozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Abkalbung untersucht. Die PBMC und Splenozyten wurden *ex vivo* mit dem Mitogen Concanavalin A (ConA) stimuliert und die Proliferation mittels MTT-Test (Splenozyten und PBMC) und mit dem Alamar Blue (AB)-Test (PBMC) untersucht. Bei beiden Tests wird die metabolische Aktivität der Zellen gemessen. Das Prinzip beruht auf dem Umbau eines Farbstoffs durch metabolisch aktive Zellen, wobei beim MTT-Test der Farbumschlag von gelb zu blau erfolgt und der blaue Farbstoff photometrisch gemessen wird. Beim AB-Test entsteht ein fluoreszierendes Produkt, was ebenfalls mittels Photometer erfasst wird. Gemessen anhand des Stimulationsindex SI (definiert als Verhältnis der optischen Dichte (OD) bzw. Fluoreszenz der ConA-stimulierten Zellen zur OD bzw. Fluoreszenz der unstimulierten Zellen), wurde die Proliferation der PBMC in Abhängigkeit von der CLA-Supplementation nicht beeinflusst, allerdings stieg die Stimulierbarkeit der Zellen mit zunehmender Laktationsdauer

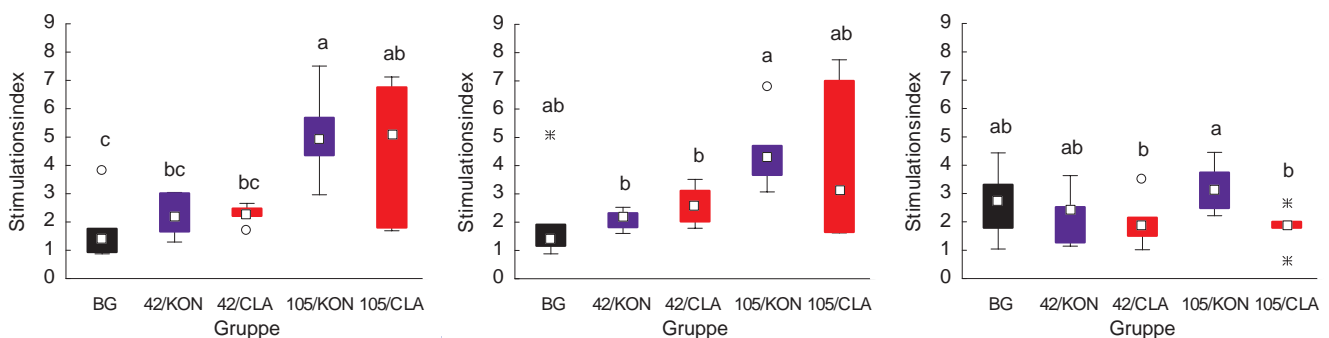


Abb 3: Effekt einer CLA-Supplementation auf den Stimulationsindex von PBMC (links: MTT-Test, Mitte: AB-Test) und Splenozyten (MTT-Test, rechts); BG= Basisgruppe, Median, □ 25/75 Quartile, ▭ Min/Max, ○ Ausreißer, * Extreme ab: unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede, $p < 0,05$, Mann-Whitney U Test.

an (Abb. 3). Bei den Splenozyten war eine Abhängigkeit der Stimulierbarkeit der Zellen von der Laktationsdauer nicht erkennbar, allerdings war die Stimulierbarkeit der Zellen bei CLA-Supplementation reduziert (Abb. 3). Dies war bei beiden CLA-Gruppen (42/CLA und 105/CLA) signifikant gegenüber der 105/KON Gruppe.

Neben den Untersuchungen zur Zellproliferation wurde die basale Expression einiger Zytokine (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α und IFN- γ) in PBMC und Splenozyten mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion analysiert. Die Expression unterlag großen tierindividuellen Schwankungen und ein gerichteter CLA-Effekt war nicht erkennbar. Allerdings war die Expression von IL-4, IL-10 und IL-12 in den Splenozyten nach 42 Tagen erhöht, was nach 105 Tagen nicht mehr der Fall war und auch in den PBMC nicht beobachtet wurde. Die Expression von TNF- α wurde durch die CLA-Fütterung nicht beeinflusst, in den Splenozyten wurde dieses prinzipiell nicht exprimiert. Die Expression von IFN- γ war sowohl in den PBMC als auch in den Splenozyten in der CLA/105-Gruppe signifikant erhöht.

Ob und wie die Zytokinexpression bei stimulierten Zellen unter dem Einfluss von CLA beeinflusst wird, müssen weiterführende Studien zeigen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Geringe Veränderungen im Vormagenstoffwechsel der Wiederkäuer infolge einer Aufnahme pansengeschützter CLA, wie die verbesserte scheinbare ruminale Verdaulichkeit der Stärke und die geringere Effizienz in der Synthese von Mikrobenprotein, sprechen gegen einen vollständigen Schutz des eingesetzten Präparates.

Die CLA-bedingte Reduzierung der Milchfettsynthese führt zwar zu einem Minderbedarf an Energie, dieser wird jedoch durch die höhere Milchleistung und den damit verbundenen Mehrbedarf für Laktose weitgehend wieder aufgebraucht. Dosisabhängig kann die höhere Milchmenge bei zu geringer Reduzierung der Milchfettsynthese sogar einen Mehrbedarf für die Milchfettsynthese bedeuten. Ein deutlicher Energiespareffekt durch verringerte Syntheseleistungen für Milchfett ist somit eher als gering einzustufen, jedoch nicht ausgeschlossen, und hängt von der eingesetzten CLA-Dosis und der Stärke der damit verbundenen Reduzierung der Milchfettsynthese ab.

Nachteilige CLA-Effekte auf die Entwicklungen des Lebergewichtes und der verschiedenen Körperfettdepots konnten nicht gezeigt werden. Die Entwicklung des retroperitonealen Fettdepots unter CLA-Einfluss ist eher als positiv für die Milchkuh einzustufen. Offen bleibt, ob dieser Effekt durch einen indirekten Einfluss über den Energiehaushalt der Milchkuh hervorgerufen wird oder der Fettstoffwechsel direkt, auf Ebene der Fettzellen in den Körperfettdepots, durch CLA beeinflusst wird.

In Bezug auf das Immunsystem lässt sich schlussfolgern, dass die Funktionalität der PBMC durch die CLA-Supplementation nicht beeinflusst scheint, allerdings wurde die Stimulierbarkeit der Splenozyten reduziert.

LITERATUR

- PAPPRITZ, J., U. MEYER, , R. KRAMER, E.-M. WEBER, G. JAHREIS, J. REHAGE, G. FLACHOWSKY, AND S. DÄNICKE. 2011. Effects of long-term supplementation of dairy cow diets with rumen-protected conjugated linoleic acids (CLA) on performance, metabolic parameters and fatty acid profile in milk fat. Arch Anim Nutr. In Press.
- von Soosten, D., U. Meyer, E. M. Weber, J. Rehage; G. Flachowsky, and S. Dänicke. 2011. Effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) on performance, adipose depot weights and liver weight in early lactation dairy cows. J Dairy Sci. Accepted.

Institut für Tierschutz und Tierhaltung (ITT)

PRÄVALENZ UND SCHWEREGRAD VON FUßBALLENDERMATITIS IN DER GEFLÜGELMAST IN ABHÄNGIGKEIT VON DER EINSTREUART

Jutta Berk

In der Mast von Broilern und Puten findet man häufig Veränderungen an den Fuß- und Zehenballen, die als Fußballendermatitis oder plantare Pododermatitis bezeichnet werden. Fußballendermatitis ist gekennzeichnet durch entzündliche Veränderungen der Haut im Bereich der Metatarsal- und Digitalballen in Form von Hyperkeratosen und Verfärbungen bis zu schweren Ulzerationen. Die Ursachen für das Auftreten von Fußballendermatitis sind komplex. Als wesentliche Faktoren werden die genetische Disposition, das Geschlecht und die Lebendmasse der Tiere, die Hautstruktur, Fütterungseinflüsse sowie das Einstreumaterial und die Feuchte der Einstreu diskutiert. Es wird vermutet, dass die Einstreu-feuchte ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Pododermatitis darstellt (Mayne, 2005). Tiefergehende, schwere Läsionen können neben einer Beeinflussung der Lauffähigkeit der Tiere aufgrund von Schmerzen auch zu einem gesundheitlichen Problem werden, da sie das Eindringen von nachfolgenden Infektionserregern begünstigen. Aufgrund der Einschränkung der Laufaktivität sitzen die Tiere eventuell häufiger, so dass verstärkt Veränderungen im Brustbereich auftreten, die zu einer Verminderung der Schlachtkörperqualität im Brustbereich führen können. In Beständen mit hochgradigen Läsionen kann es zu Leistungsdepressionen durch eine verringerte Futter- und Wasseraufnahme kommen. Pododermatitis besitzt somit nicht nur Tierschutzrelevanz, sondern ist auch aus gesundheitlichen und wirtschaftlichen Aspekten nicht zu vernachlässigen. Schwerpunktmäßig wurde im Institut für Tierschutz und Tierhaltung die Eignung alternativer Einstreuarten als Mög-

lichkeit zur Reduktion von Fußballendermatitis und deren Auswirkungen auf Tierleistungen, Tiergesundheit und Tierverhalten bei Broilern und Puten untersucht.

UNTERSUCHUNGEN BEI BROILERN (MASTHÜHNER)

Häckselstroh und Hobelspäne stellen die in Deutschland am häufigsten verwandten Einstreuarten in der Hähnchenmast dar. Dinkelspelzen werden aufgrund der Verfügbarkeit vorrangig regional eingesetzt, während Pelletinos (Pelletino® Strohstreugranulat G) in der Praxis zum Nachstreuen genutzt werden. Die Herstellung von Pelletino® Strohstreugranulat G erfolgt durch Mahlen von Stroh, sodass feinste Strohfasern entstehen, und anschließendem Pressen bei hohen Temperaturen. HygieneHolz-Späne bestehen aus speziell aufbereitetem Kiefernholz, das antibakterielle Eigenschaften aufweist.

In zwei Versuchsdurchgängen mit jeweils 20 Versuchsabteilen (2 x 2 Meter) und 1200 männlichen Broilern der Herkunft Ross 308 (60 Tiere/Abteil) wurden fünf Einstreuarten (Häckselstroh, Hobelspäne, Dinkelspelzen, Pelletino® Strohstreugranulat G, HygieneHolz-Späne) untersucht. Die Broiler wurden 35 Tage gehalten. Am Versuchsbeginn wurden zehn zufällig ausgewählte Tiere pro Abteil individuell gekennzeichnet. Diese wurden wöchentlich gewogen und das Vorkommen und der Schweregrad von Fußballendermatitis einzeln für beide Füße beurteilt (Abb. 1).



Abb 1:
Beurteilung der Metatarsalballen bei Masthähnchen

In Abhängigkeit von der Einstreuart waren erste Läsionen an den Fußballen bereits im Alter von sieben Lebenstagen zu beobachten. Bei allen Einstreuvarianten bis auf Häckselstroh war ein Anstieg des Scores und damit des Schweregrades der Läsionen bis zum Ende der Mast zu beobachten. Im Mittel beider Durchgänge wiesen die Broiler auf Häckselstroh den schlechtesten Score (1,54) auf. Tiere auf Pelletinos (0,38), gefolgt von HygieneHolz-Spänen (0,55), Hobelspänen (1,00) und Dinkelspelzen (1,03) hatten signifikant ($p < 0,0001$) geringere Läsionen. Die Gruppen auf Dinkelspelzen und Hobelspänen unterschieden sich nicht.

Im Mittel der Versuchsdurchgänge wurden 92,5 Prozent der Broiler, die auf Häckselstroh gehalten wurden, mit Score 2 (tief eingedrungene Läsionen) beurteilt (Abb. 2). Nur 6,3 Prozent konnten mit Score 1 (oberflächliche Läsionen) eingestuft werden und 1,2 Prozent (Score 0) wiesen keine Veränderungen an den Fußballen auf. Im Gegensatz dazu hatten 36,9 Prozent der auf Pelletinos gehaltenen Masthühner keine Veränderungen an den Fußballen (Score 0), 31,9 Prozent wiesen geringfügige (Score 1) und 31,2 Prozent tiefeingedrungene Läsionen (Score 2) auf. Die zweitbeste Variante waren die HygieneHolz-Späne, wobei der Anteil Broiler mit Score 0 (18,1 Prozent) gegenüber den Pelletinos um etwa die Hälfte reduziert war.

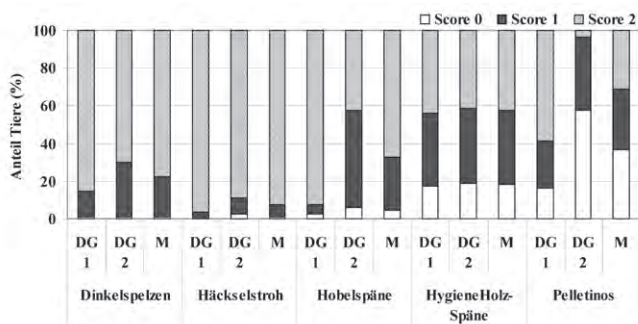


Abb 2: Bewertung der Fußballen in den Durchgängen (DG) und im Mittel der beiden Versuche (M) am 35. Lebenstag (LSMeans)

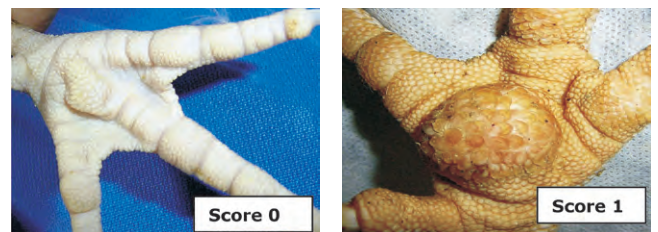
In beiden Durchgängen wiesen die auf Pelletinos gehaltenen Broiler den geringsten Anteil Fußballenläsionen und die höchsten Lebendmassen am Versuchsende auf, während kein Effekt auf die Mortalität nachweisbar war.

Die Untersuchung zeigte, dass die Prävalenz und der Schweregrad von Pododermatitis sowie die Tierleistungen durch die Einstreuart beeinflusst werden können. Das in Deutschland in der Praxis am häufigsten eingesetzte Häckselstroh erwies sich in dieser Studie als die am wenigsten geeignete Variante.

UNTERSUCHUNGEN BEI PUTENHENNEN

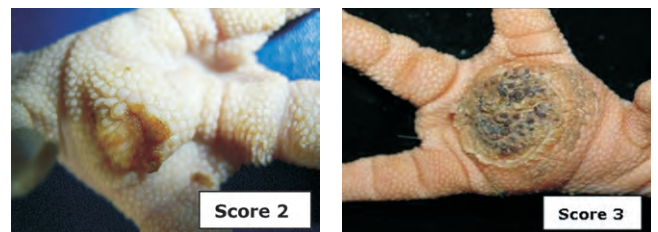
In Deutschland werden in der Praxis am häufigsten Hobelspäne in der Aufzuchtphase und anschließend Häckselstroh in der Putenmast eingesetzt. Teilweise erfolgt die gesamte Mast auch ausschließlich auf Hobelspänen. Neben diesen üblichen Einstreuarten wurde Lignocellulose als alternative Einstreuart erstmalig in diesem Versuch verwandt. Für die Herstellung von Lignocellulose wird Weichholz genutzt, das durch Zerkleinerung zu weichen und flexiblen Fasern verarbeitet wird. Anschließend erfolgt eine Pelletierung und Granulierung unter Zusatz eines synergistisch wirksamen Pflanzenextraktes, um eine Keimreduzierung zu erzielen.

In zwei Versuchsdurchgängen (jeweils 12 Bodenabteile, 18 Quadratmeter, 85 Hennen/Abteil) mit insgesamt 2040 weiblichen Puten (B.U.T. Big 6) wurden in der Aufzuchtperiode (1. bis 6. Lebenswoche) zunächst sechs Gruppen auf Hobelspänen und sechs auf Lignocellulose eingestallt. Mit Beginn der Mastperiode (7. bis 16. Lebenswoche) wurden die Tiere weiterhin auf Lignocellulose bzw. Hobelspänen gehalten oder es erfolgte ein entsprechender Wechsel der Einstreu von Hobelspänen zu Häckselstroh (Praxisvariante), Lignocellulose zu Hobelspänen und Lignocellulose zu Häckselstroh. Eine Beurteilung jeweils beider Fußballen erfolgte von der zweiten bis zur sechsten Lebenswoche wöchentlich, anschließend in der 9., 12. und 15. Lebenswoche mit einem etwas abgewandelten Scoringssystem im Vergleich zu Masthähnchen und Putenhähnen (Abb. 3).



Ohne sichtbare Läsionen

Hyperkeratose



Oberflächliche Pododermatitis

Tief eingedrungene Pododermatitis

Abb 3: Beurteilung der Metatarsalballen bei Putenhennen

Unabhängig von der Einstreuvariante fanden wir einen Anstieg in der Prävalenz und dem Schweregrad der Pododermatitis mit zunehmendem Tialter. Externe Veränderungen an den Fußballen waren bereits zum ersten Beurteilungszeitpunkt in der zweiten Lebenswoche feststellbar. Bei den



Varianten mit Hobelspänen war ein Anstieg des Scores frühzeitiger (ab 4. Lebenswoche) vorhanden, während eine Zunahme bei den auf Lignocellulose gehaltenen Hennen nach dem Wechsel der Einstreu ab der 6. Lebenswoche eintrat und in Abhängigkeit von der anschließend verwandten Einstreuart differierte. Die Gruppen, die ausschließlich auf Lignocellulose gehalten wurden, hatten auch am Ende der Untersuchung noch die besten Fußballen bei einem mittleren Score von 1,77. Für die anderen Varianten lagen die Werte in einem Bereich von 1,94 (Hobelspäne) über 1,97 (Hobelspäne-Häckselstroh) und 2,02 (Lignocellulose-Hobelspäne) eng beieinander (Abb. 4).

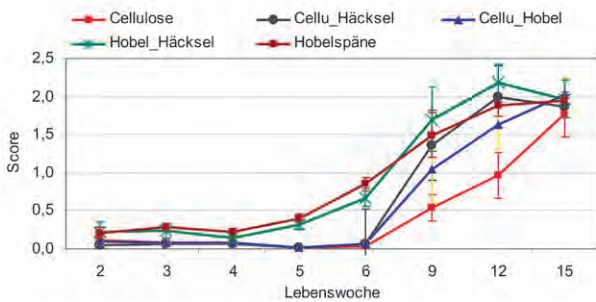


Abb 4: Durchschnittliche Fußballenläsionen in Abhängigkeit von den Einstreuarten und dem Lebensalter (Mittelwert aus beiden DG, 15. Lebenswoche, LSMMeans ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes))

Die Bewertung der Fußballen zeigte, dass der Schweregrad der Läsionen in Abhängigkeit von der verwandten Einstreu signifikant differierte. Putenhennen, die über den gesamten Zeitraum bzw. nur während der Aufzuchtphase auf Lignocellulose gehalten wurden, konnten häufiger mit der Note 0 (keine Läsionen) bewertet werden als die Einstreuvarianten mit Hobelspänen bzw. Wechsel von Hobelspänen zu Häckselstroh. In den Abteilen mit Lignocellulose ohne Einstreuwechsel wurden im Durchschnitt beider Durchgänge über alle Beobachtungszeiträume der höchste Anteil Tiere mit Score 0 (69,4 Prozent) und der geringste Anteil (2,5 Prozent) mit Score 3 (tiefeingedrungene Pododermatitis) eingestuft. Für die Abteile mit Wechsel von Hobelspänen zu Häckselstroh als schlechteste Variante lagen die entsprechenden Werte bei 46,8 Prozent (Score 0) und 9,8 Prozent für Score 3. Aus Sicht der Fußballengesundheit scheint die alternative Einstreuart Lignocellulose einen positiven Einfluss auf das Vorkommen und den Schweregrad von Pododermatitis auszuüben. In der Praxis wird diese Einstreuart mittlerweile unter dem Namen SoftCell erfolgreich in verschiedenen Bereichen der Geflügelhaltung eingesetzt. Die Vorteile werden trotz der vergleichsweise höheren Kosten zu den üblichen Praxisvarianten (Hobelspäne/Häckselstroh bzw. nur Hobelspäne) vor allem im gesundheitlichen Bereich (Fußballenläsionen) und der Arbeitszeiterparnis (Zeit für das Nachstreuen) sowie in der insgesamt geringeren Einstreumenge von Praktikern gesehen.

UNTERSUCHUNGEN BEI PUTENHÄHNEN

In zwei Versuchsdurchgängen mit Putenhähnen (1224 Hähne, B.U.T. Big 6) erfolgte der Einsatz von drei unterschiedlichen Einstreuarten (Hobelspäne, Lignocellulose, Pelletinos) nur während der Aufzuchtphase bis zur sechsten Lebenswoche. Nach der sechsten Lebenswoche wurde einheitlich Häckselstroh eingesetzt, das mittels einer Strohühle erzeugt wurde und daher über eine bessere Saugfähigkeit im Vergleich zu herkömmlichem Häckselstroh verfügt. Die Hähne waren in sechs Bodenabteilen (36 Quadratmeter, 102 Tiere/ Abteil) untergebracht. Am ersten Lebenstag wurden 50 Prozent der Tiere aus jedem Abteil mit Transpondern für die individuelle Identifizierung bei den späteren Beurteilungen der Fußballen und Ermittlungen der Lebendmassen versehen. Die Fußballen wurden von der 2. bis zur 6. Lebenswoche wöchentlich, dann in der 10., 15. und 20. Lebenswoche beurteilt. Die Beurteilung erfolgte analog dem Versuch mit den Broilern (Abb. 1).

Wir fanden keinen nachhaltigen Einfluss der unterschiedlichen Einstreuarten während der Aufzuchtphase auf den Pododermatitisscore oder die Tierleistungen. Die Mortalität und die Lebendmassen wurden aber durch den Versuchsdurchgang beeinflusst. Prävalenz und Schweregrad der Pododermatitis erhöhten sich nach dem Wechsel der Einstreuart ab der sechsten Lebenswoche in allen Gruppen (Abb. 5). Ein signifikanter Effekt der Einstreuart konnte nur für die 10. Lebenswoche ermittelt werden. Putenhähne, die bis zur sechsten Lebenswoche auf Lignocellulose gehalten wurden, hatten zu diesem Zeitpunkt einen geringeren Score im Vergleich zu Tieren auf Hobelspänen (0,47 vs. 0,83, $p=0.0356$).

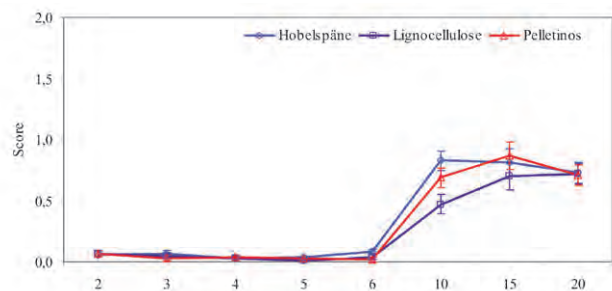


Abb 5: Durchschnittliche Fußballenläsionen in Abhängigkeit von den Einstreuarten und dem Lebensalter (Mittelwert aus beiden DG, LSO-Means ± SE)

Insgesamt lag der Score für Pododermatitis in diesen beiden Durchgängen auf einem niedrigeren Niveau unabhängig von der verwandten Einstreu im Vergleich zu den beiden Untersuchungen mit Broilern und Putenhennen. Der mittlere Fußballenscore lag bei 0,7 in der 20. Lebenswoche, das bedeutet, es wurden vorrangig Hyperkeratosen und geringe Läsionen gefunden. Eine Erklärung dafür könnte die modifizierte Stroheinstreu sein, die wahrscheinlich über eine bessere Wasserbindungskapazität verfügt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verwendung unterschiedlicher Einstreuarten in der Aufzuchtphase keinen nachhaltigen Effekt auf den Schweregrad und das Vorkommen von Pododermatitis und die Tierleistungen in dieser Untersuchung mit Putenhähnen hatte. Es scheint, dass durch die Verwendung von modifiziertem Häckselstroh mit erhöhter Saugfähigkeit eine Verbesserung der Fußballengesundheit auch mit in den Betrieben üblichem und verfügbarem Einstreumaterial, nämlich Stroh, möglich ist.

LITERATUR

- BERK, J. 2007. Can alternative kinds of litter reduce foot pad lesions in female turkeys? Proceedings of the 4th International symposium on turkey production. Berlin, Germany, (ed. Hafez, H.M.), Mensch-und-Buch-Verlag, Berlin: 143-149.
- BERK, J. 2009. Effects of different types of litter on performance and pododermatitis in male turkeys. 5th International Symposium on Turkey Production, Berlin 28-30 May 2009: 29-30.
- BERK J. 2009. Einfluss der Einstreuart auf Prävalenz und Schweregrad von Pododermatitis bei männlichen Broilern. Berl Münch Tierärztl Wschr 122:257-263.
- MAYNE, R.K. 2005. A review of the aetiology and possible causation factors of foot pad dermatitis in growing turkeys and broilers. World's Poultry Sci J 61:256-267.

Weitere Literatur kann bei der Verfasserin angefordert werden.

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen (IBIZ)

CLOSTRIDIUM DIFFICILE, EIN POTENTIELL ZONOTISCHER ENTERITISERREGER

Alexander Schneeberg, Heinrich Neubauer, Christian Seyboldt

Clostridium difficile ist ein Gram-positives, endosporenbildendes, anaerobes Stäbchenbakterium, das im Boden und Wasser sowie in geringer Zahl als Kommensale im Darm von Mensch und Tier zu finden ist. *Clostridium (C.) difficile* kann beim Menschen unter bestimmten Umständen, zum Beispiel während oder nach antibiotischer Therapie, als Infektionserreger verschiedene Formen von Durchfallerkrankungen hervorrufen. Das klinische Spektrum der so genannten *Clostridium-difficile*-Infektionen (CDI) reicht von einer leichten Diarrhö bis zur fulminanten und lebensbedrohlichen pseudomembranösen Kolitis. Verursacht werden die Symptome durch die beiden wesentlichen Virulenzfaktoren von *C. difficile*: zwei große Exotoxine (Toxin A und B), die potent zytotoxisch auf die Mucosa des Darmes wirken. Die Assoziation der Erkrankung mit einer Antibiotika-Behandlung wird durch die therapiebedingte Störung der Darmflora erklärt, wodurch eine dominierende Kolonisierung des Darmes mit *C. difficile* ermöglicht wird. Hauptsächlich sind Menschen im Alter von über 60 Lebensjahren von der CDI betroffen. In etwa 80 Prozent der Fälle sind die Infektionen mit dem Aufenthalt des Betroffenen in einem Krankenhaus verbunden. *C. difficile* ist der Haupterreger von nosokomialen (im Krankenhaus erworbenen) Durchfallerkrankungen und verursacht unter anderem durch die intensive Therapie und verlängerte Krankenhausaufenthalte in Europa geschätzte Kosten von bis zu drei Milliarden Euro pro Jahr. Seit 2001 werden weltweit epidemiologische Veränderungen von *C.-difficile*-Infektionen beobachtet. Die Morbidität und Mortalität scheint zuzunehmen, zum Teil konnte dieser Anstieg mit dem Auftreten eines neuen, besonders virulenten Stammes, bezeichnet als Ribotyp 027 (synonym: Toxinotyp III, PFGE NAPI), verbunden werden. Möglicherweise spielt auch die zunehmende Verwendung von Fluorochinolon-Derivaten und Makroliden in der Antibiotikatherapie eine Rolle. Die Empfindlichkeit einiger *C.-difficile*-Stämme, einschließlich des besonders virulenten Ribotyp 027, gegenüber diesen Antibiotika hat deutlich abgenommen. Neben seiner Resistenz gegen neuere Fluorochinolone und Makrolide wird die gesteigerte Virulenz des Ribotyp 027 im Wesentlichen durch eine verstärkte Toxinbildung und durch ein strukturell verändertes Toxin B mit höherer zytotoxischer Potenz erklärt. Alle Ribotyp-027-Stämme verfügen zudem über ein weiteres, binäres Toxin (CDT), dessen Anteil an der Pathogenese noch nicht vollständig geklärt, aber wahrscheinlich von klinischer Relevanz ist. Darüber hinaus zeigen Ribotyp-027-Stämme höhere Sporulationsraten als die bisher in Er-

scheinung getretenen Stämme von *C. difficile*. Als Reaktion auf die weltweite Zunahme wurde in Deutschland 2007 eine Meldepflicht für schwer verlaufende Infektionen mit *C. difficile* eingeführt. Im Jahr 2009 wurden insgesamt 372 Fälle von *Clostridium-difficile*-Infektionen erfasst, auf die die Kriterien eines schweren Verlaufs zutrafen. Europaweit traten Infektionen mit *C.-difficile*-Ribotyp-027-Stämmen in 16 Staaten auf. Von einem weiteren hochvirulenten Stamm, bezeichnet als Ribotyp 078, wurde in fünf europäischen Staaten berichtet.

Eine weitere epidemiologisch bemerkenswerte Veränderung betrifft die Wahrnehmung von *C. difficile* Infektionen als Ursache von Durchfallerkrankungen, die außerhalb von Krankenhäusern erworben wurden. Seit einigen Jahren werden ansteigende Fallzahlen auch bei jungen Menschen beobachtet, die nach aktuellen Maßstäben kein erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweisen. Ob dieser Beobachtung eine Veränderung des Erregers in seinem Infektionsverhalten zugrunde liegt, oder ob sie der erhöhten Aufmerksamkeit geschuldet ist, bleibt fraglich.

C. difficile wird ebenfalls mit Durchfallerkrankungen bei Tieren in Verbindung gebracht. Neben zahlreichen Wildtieren sind auch Haus- und Nutztiere, vor allem Pferde und Schweine, von *C. difficile* bedingten Durchfallerkrankungen betroffen. Von wirtschaftlicher Bedeutung ist *C. difficile* insbesondere bei Schweinen. Die Infektion kann bei Saugferkeln zu verlustreichen Enteritiden führen und wurde bisher vor allem in den Vereinigten Staaten beobachtet, während aus Europa bisher keine Berichte über das Auftreten der Erkrankung vorliegen.

Die Frage, ob Tiere möglicherweise ein natürliches Reservoir für *C. difficile*-Stämme mit besonderer Virulenz für Menschen sein könnten, wird in der wissenschaftlichen Literatur seit einigen Jahren thematisiert. In der Tat findet man eine hohe Übereinstimmung von Ribotypen bei zahlreichen Isolaten von Mensch und Tier. Beispielsweise konnten aus durchfallerkrankten und gesunden Kälbern der auch von Menschen isolierte Ribotyp 017 und der besonders virulente Ribotyp 027 isoliert werden. Der ebenfalls als hochvirulent eingestufte Ribotyp 078 wurde bei Rindern und Schweinen nachgewiesen. Ein weiterer Hinweis auf das zoonotische Potential des Erregers könnte die veränderte Prävalenz von *C.-difficile*-Stämmen sein, die das Gen für das binäre Toxin (CDT) tragen. In früheren Studien war die Prävalenz solcher Stämme beim Menschen gering, sie lag im Allgemeinen zwischen 1,6 Prozent und 10 Prozent

in nicht-Ausbruch-Situationen. Im Gegensatz dazu lag die Prävalenz von *CDT*-positiven tierischen Isolaten zwischen 23 Prozent und 100 Prozent. In den letzten Jahren nahm der Anteil *CDT*-positiver Stämme bei Menschen deutlich zu. Einige Krankenhäuser protokollieren inzwischen mehr als 50 Prozent aller *C.-difficile*-Isolate als positiv für das binäre Toxin. Es ist möglich, dass *CDT*-tragende Ribotypen aus einem tierischen Reservoir auf den Menschen übertragen wurden und so die Proportionen veränderten. Interessanterweise scheint das Auftreten von *CDT*-positiven Stämmen mit den ambulant erworbenen CDI in Verbindung zu stehen. Ein bemerkenswertes Indiz, da gerade für diese 20 Prozent der *C.-difficile*-Durchfallerkrankungen eine zoonotische Übertragung besonders wahrscheinlich erscheint. Ein möglicher Weg für die Übertragung des Erregers vom Tier auf den Menschen könnte der Verzehr kontaminierter Lebensmittel sein. Hierzu wurden inzwischen Studien aus mehreren Ländern und zu unterschiedlichen Lebensmitteln veröffentlicht. In Abhängigkeit der untersuchten Lebensmittel und der Länder schwankt der Anteil *C.-difficile*-positiver Proben zwischen 0 und 20 Prozent. Neben Lebensmitteln kann auch der Kontakt zu Haustieren einen zoonotischen Infektionsweg darstellen, hier sind insbesondere wegen des oftmals intensiven Kontakts zum Menschen Hunde und Katzen von Interesse. *C. difficile* kann bei diesen Tieren Durchfallerkrankungen auslösen, wird aber auch bei bis zu 40 Prozent klinisch gesund erscheinender Tiere nachgewiesen. Die wenigen verfügbaren Publikationen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass hier ebenfalls Ribotypen isoliert werden können, die bei humaner CDI relevant sind. Insgesamt weist eine zunehmende Anzahl von Studien darauf hin, dass *C.-difficile*-Stämme zwischen Tier und Mensch weitergegeben werden können. Eine abschließende Risikobewertung zum zoonotischen Potential von *C. difficile* ist derzeit jedoch nicht möglich: Im gesamten europäischen Raum, insbesondere in Deutschland sind die verfügbaren Daten über die bei Haus- und Nutztieren auftretenden Ribotypen und Prävalenzen von *C. difficile* lückenhaft.

Eine wichtige Voraussetzung für epidemiologische Studien und eine mögliche Bewertung des zoonotischen Potentials ist die Sammlung und Typisierung veterinärmedizinischer *C.-difficile*-Stämme. Die Isolation des Erregers kann durch den Direktausstrich einer Kotprobe und/oder Anreicherungskultur in Flüssigmedium erreicht werden. Im Anschluss an die Anreicherungskultur erfolgt meist eine Sporenselktion durch die Inaktivierung der vegetativen Bakterienzellen mittels Ethanolzugabe und die weitere Kultivierung auf Festnährböden. Kommerzielle Selektivnährmedien mit Antibiotikazusätzen (z.B. CDMN-Agar, Oxoid) eignen sich für die Isolation (Abb. 1). Die typische Form der Kolonien und biochemische Charakteristika, wie grüne Fluoreszenz bei 360 nm, der charakteristische Geruch nach *p*-Kresol und das Vorhandensein einer L-Prolin-Aminopeptidase erleichtern die Isolation verdächtiger Kolonien.

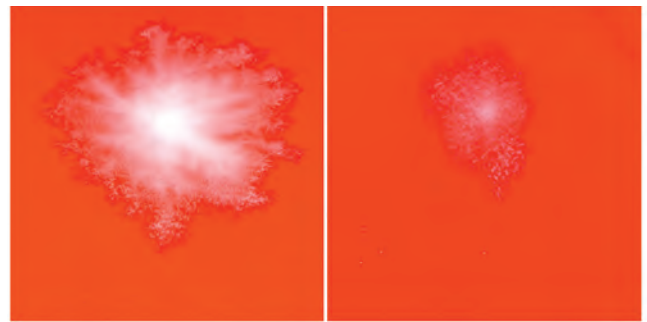


Abb 1:

Typische Koloniemorphologie von *C. difficile* nach 3 Tagen anaerober Inkubation auf selektiven Festnährböden: CDMN (*Clostridium-difficile*-Moxalactam-Norfloxacine)-Nährboden (links), Koloniedurchmesser ca. 10 mm und CCFA-Nährboden (Cycloserin-Cephoxitin-Fruktose-Agar) (rechts), Koloniedurchmesser ca. 5 mm.

Die molekulare Typisierung von *C. difficile* kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. Häufig angewandte Methoden sind derzeit die Restriktions-Endonuclease-Analyse (REA), die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und die PCR-Ribotypisierung. In den letzten Jahren fand insbesondere die PCR-Ribotypisierung internationale Akzeptanz und Verbreitung. Bei dieser Methode wird eine Region des rDNA-Operons zwischen der 16S- und 23S-rDNA durch PCR amplifiziert (Abb. 2 A).

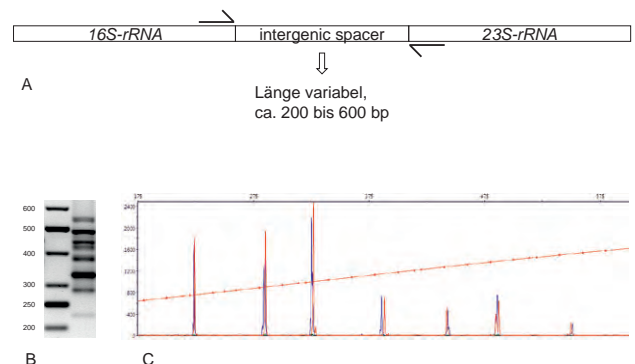


Abb 2:

A): Schematische Darstellung des rDNA-Operons von *C. difficile*, es kommt ca. 10 mal pro Genom vor, die Region des „intergenic spacer“ variiert in ihrer Länge. Die Bindungsstellen der PCR-Ribotypisierungsprimer werden durch halbe Pfeile symbolisiert.

B): Ribotypisierung durch Amplifikation der Spacerregion. Nach der Auftrennung im Agarosegel ergibt sich für jeden PCR-Ribotyp ein charakteristisches Muster aus unterschiedlich langen Amplifikaten. Größenangaben in bp.

C): Durch die Verwendung einer Kapillarelektrophorese werden Daten generiert, die in hohem Maß reproduzierbar sind und damit die Grundlage für die Vergleichbarkeit der Typisierung zwischen Laboratorien bilden können. X-Achse: Fluoreszenzintensität, Y-Achse: Größe in bp.

Da das rDNA-Operon bei *C. difficile* in etwa 10 mal vorkommt und die amplifizierte Region in ihrer Länge variiert, entsteht bei der PCR ein Gemisch von Amplifikaten unterschiedlicher Länge. Nach der Auftrennung im Agarosegel ergibt sich für jeden PCR-Ribotyp ein charakteristisches Muster (Abb. 2 B). Durch Vergleiche mit den Mustern bekannter PCR-Ribotypen erfolgt dann eine Zuordnung bzw. Identifikation. Obwohl es für die Auswertung Softwarelösungen gibt, ist diese Vorgehensweise zeitaufwändig und birgt Fehlerquellen. Ergebnisse der PCR-Ribotypisierung aus unterschiedlichen Laboratorien sind deshalb nur schwer miteinander vergleichbar. Durch die Verwendung einer Kapillarelektrophorese können diese Probleme weitestgehend überwunden werden. Der Zeitaufwand für die Typisierung einzelner Stämme kann durch diese Technik um etwa 75 Prozent reduziert werden, bei gleichzeitiger Bearbeitung vieler Stämme (96-Well-Plattenformat) ist der Zeitvorteil noch größer. Die Methode erzeugt darüber hinaus Daten, die in einem hohen Maße reproduzierbar sind (± 1 Base) und damit die Grundlage für deren Vergleichbarkeit auch zwischen Laboratorien bilden (Abb. 2 C). Ein noch größeres diskriminatorisches Potential bietet die Multilocus-Variable-Number of Tandem-Repeat Analysis (MLVA), eine Methode, die routinemäßig für Ausbruchsuntersuchungen verwendet wird. Zur weiteren Charakterisierung der *C.-difficile*-Isolate wird ihre Ausstattung mit Toxingenen festgestellt. Mittels spezifischer PCR-Nachweise wird das Vorhandensein der Gene für die Hauptvirulenzfaktoren Toxin A und Toxin B sowie des binären Toxins überprüft.

Da aus Deutschland bisher noch keine Erkenntnisse zum Vorkommen und den auftretenden PCR-Ribotypen von *C. difficile* bei Haus- und Nutztierbeständen vorliegen, wurde in einer ersten orientierenden Erhebung die Prävalenz und Ribotypenverteilung des Erregers bei Hunden und Katzen in 10 Tierheimen des Bundeslandes Thüringen untersucht. Etwas mehr als fünf Prozent der Hundekotproben und ca. vier Prozent der Katzenkotproben waren positiv für *C. difficile*. Die erhaltenen Isolate konnten sechs unterschiedlichen PCR-Ribotypen zugeordnet werden, zwei davon entsprachen den bekannten Ribotypen 010 und 039, die bereits von anderen Tierarten und auch von Menschen isoliert wurden. Vier Ribotypen konnten zunächst keinem Vergleichs-Ribotyp zugeordnet werden.

Literatur kann bei den Verfassern angefordert werden.

Institut für molekulare Pathogenese (IMP)

NUTZTIERMODELLE FÜR DIE INTERDISZIPLINÄRE BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNG

Petra Reinhold und Christian Menge

Trotz aller Möglichkeiten moderner Zellkulturverfahren bis hin zur Generierung dreidimensionaler Kulturen sind zur Aufklärung komplexer Interaktionen innerhalb eines Organismus Tiermodelle weiterhin unverzichtbar. Beflügelt durch die Möglichkeit der Generierung von Knock-out-Tieren nimmt in der biomedizinischen Forschung die Zahl der Nagetiermodelle, die „stellvertretend“ für den Menschen eingesetzt werden, kontinuierlich zu. Dies spiegelt sich nicht nur in den für Deutschland dokumentierten Versuchstierzahlen wider, auch die für Tiermodelle bewilligten Forschungsgelder fließen zunehmend in Nagetiermodelle. Derzeit werden 98 – 99 Prozent aller Versuche an Nagetieren und nur 1 – 2 Prozent an domestizierten Tieren bzw. landwirtschaftlichen Nutztieren durchgeführt.

Dass 17 Nobelpreise an Wissenschaftler verliehen wurden, die Rinder, Pferde, Schafe oder Geflügel als biomedizinische Modelle nutzten, ist dagegen kaum bekannt (Ireland *et al.* 2008). Die Möglichkeit, durch Verwendung von Nutztieren Untersuchungen in der eigentlichen Zielspezies durchführen zu können, wird vor allem in der veterinärmedizinischen Grundlagenforschung genutzt und stellt hier ein Alleinstellungsmerkmal dar. Durch das Auftreten neuer sowie das Wiedererstarken alter zoonotischer Infektionskrankheiten und der sich daraus ergebenden Notwendigkeit, Interaktionen der Erreger mit ihren natürlichen (tierischen) Wirten aufzuklären zu müssen, wird zunehmend deutlich, dass die Verwendung von Tieren der Zielspezies sowohl für die Veterinär- als auch für die Humanmedizin erhebliches Potential birgt (Tab. 1).

Darüber hinaus sind Nutztiere als „komparative Modelle“ in zahlreichen Forschungsrichtungen (z. B. Ernährung und Stoffwechsel, postnatale Entwicklung und Altersforschung, Epigenetik und Umweltfaktoren, Neurobiologie) Nagetieren überlegen (Ireland *et al.* 2008).

Der Einsatz domestizierter Tiere in Tierversuchen hat im Allgemeinen eine geringere ethische Akzeptanz. Im Vergleich zu Nagetiermodellen sind Versuche mit Nutztieren teurer, arbeitsintensiver und zeitaufwändiger. Es ist jedoch grundsätzlich abzuwägen, ob die Schädigung oder der Tod von Tieren – gleich welcher Spezies – verhältnismäßig ist. Die auf dem aktuellen Stand des Wissens begründete biologische Relevanz muss bei der Wahl der Tierart im Vordergrund stehen. Wird diese ökonomischen, pragmatischen oder ethischen Gründen untergeordnet, besteht die Gefahr, dass aus wenig relevanten Modellen irrelevante Hypothesen abgeleitet werden (Haley 2003, Hein & Griebel 2003, Martinez-Olondris *et al.* 2010). Resultieren aus diesen Hy-

pothesen wiederum klinische Studien, so sind diese nicht nur nutzlos, sondern sind ethisch ebenfalls fragwürdig und verschwenden wissenschaftliche Ressourcen. Ist die Durchführung von Tierversuchen nicht zu vermeiden, forderten Russel & Burch (1959) bei der Formulierung des 3R-Prinzips [„Refinement“ (Verfeinerung), „Reduction“ (Verringerung), „Replacement“ (Vermeidung)], dass Versuchstierzahlen zumindest zu reduzieren und die Belastungen für Versuchstiere zu vermindern sind. Bei genauerer Betrachtung sind Nutztiermodelle sowohl im Hinblick auf die biologische Relevanz als auch im Hinblick auf die Möglichkeit zur Verbesserung und zur Reduktion der Versuche Nagetiermodellen häufig überlegen.

EINE LANGE LEBENSZEIT ERLAUBT DIE ERFORSCHUNG CHRONISCHER ERKRANKUNGEN UND DIE ERFORSCHUNG CHRONISCHER INFEKTIONEN IN NATÜRLICHEN ERREGER-WIRT-SYSTEMEN

Infolge des geringen Lebensalters sind Nagetiere zur Untersuchung komplexer Mechanismen chronischer Erkrankungen, deren Manifestation den Zeitraum von Jahren umfasst, nicht geeignet. Ein typisches Beispiel hierfür sind chronisch-obstruktive Atemwegserkrankungen des Menschen (Asthma oder COPD), die in artifiziellen murinen Modellen nur unzureichend darstellbar sind. Natürlich vorkommende chronisch-obstruktive Atemwegserkrankungen bei Tieren (Asthma bei Katzen oder chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen bei Pferden) weisen hingegen pathogenetische Parallelitäten zur humanen Erkrankung auf und sind als Tiermodell etabliert (Kirschvink & Reinhold 2008).

Rezidivierende oder anhaltende Expositionen gegenüber sog. „atypischen Erregern“ (Chlamydien, Mykoplasmen) bzw. Infektionen mit diesen Erregern sollten in die Pathogenese chronisch-obstruktiver Atemwegs- und Lungenerkrankungen involviert sein (Hahn *et al.* 1991, Theegarten *et al.* 2004, Rohde *et al.* 2010). Ein geeignetes Tiermodell zur Verifizierung dieser Hypothese wird seit langem gefordert (Kraft 2000), ist aber im murinen System nicht mit entsprechender biologischer Relevanz etablierbar. Im Rahmen von am FLI durchgeführten Untersuchungen wurde die Pathogenese spontan erworbener chlamydialer Infektionen bei Nutztieren in natürlichen Erreger-Wirt-Systemen untersucht. Beobachtungen an Kälbern und Jungrindern stützen die These, dass persistierende und rezidivierende Chlamydieninfektionen mit chronischen Atemwegsobstruktionen assoziiert sind (Jaeger *et al.* 2007).

Humane Erkrankung	Tierart für geeignetes Modell	zu empfehlende Literatur
nicht-infektiös		
Asthma bronchiale (allergisch)	Katze, Schaf, Hund, Pferd	Kirschvink & Reinhold (2008)
Ski-Asthma	Schlittenhunde	Davis et al. (2002, 2005)
COPD (chronic obstructive pulmonary disease)	Rind, Pferd	Kirschvink & Reinhold (2008)
zystische Fibrose (Mukoviszidose)	Schwein	Elferink & Beuers (2009)
ALI / ARDS (acute lung injury / acute respiratory distress syndrome)	Schwein, Schaf	
Schlaf-Apnoe	Hund englische Bulldogge adipöses Minischwein	Schulz et al. (2008) Hendricks et al. (1987) Lonergan et al. (1998)
Obesitas / metabolisches Syndrom	Schwein	Spurlock & Gabler (2008)
Malformationen des Skeletts Osteogenesis imperfecta	Rind Schaf	Agerholm (2008) Thompson et al. (2008)
infektiös		
Respiratorisches Synzytial Virus (RSV)	Kalb	Otto et al. (1996) Gershwin et al. (1998, 2008)
Tuberkulose	Rind	Van Rhijn et al. (2008)
Chlamydien (respiratorische Form)	Schwein Kalb Pferd	Sachse et al. (2004) Reinhold et al. (2008a) Jaeger et al. (2007) Reinhold et al. (2008b, 2010) Rohde et al. (2010) Theegarten et al. (2008)
Chlamydien (urogenitale Form)	Schaf Schwein Rind	Papp & Shewen (1996, 1997) Vanrompay et al. (2005, 2006) DeGraves et al. (2004)
multiresistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) in der Lunge	Schaf, Schwein	Martinez-Olondris et al. (2010)
Rotaviren	Kalb, Schwein	Hein & Griebel (2003)
Noroviren	Kalb	Souza et al. (2008)
Anthrax (chronische Form)	Schwein	Goossens (2009)
T-Zell Leukämie Virus	Rind	Hein & Griebel (2003)

Tabelle 1: Ausgewählte natürliche und etablierte Modelle an domestizierten Säugetierarten

INTRA-INDIVIDUELLE VERLAUFSUNTERSUCHUNGEN REDUZIEREN DIE BIOLOGISCHE VARIABILITÄT DER ERGEBNISSE

Die biologische Streuung von in Tierexperimenten mess-

baren Kenngrößen setzt sich aus der intra- und der inter-individuellen Variabilität zusammen. Allgemein gilt für physiologische Kenngrößen, dass intra-individuelle Messwertschwankungen nur etwa 25 – 30 Prozent der Gesamtvariabilität ausmachen. Die inter-individuelle Variabilität

physiologischer Parameter ist hingegen um das 3 – 4fache höher. Am Beispiel der respiratorischen Impedanz wurde die deutlich bessere Reproduzierbarkeit intra-individuell erhobener Messwerte im Vergleich zu inter-individuellen Daten etwa für Rinder, Schweine oder Schafe belegt (Reinhold *et al.* 1998, Klein & Reinhold 2001, Hildenbrand 2010). Das experimentelle Arbeiten mit Nutztieren eröffnet damit die einzigartige Möglichkeit, individuelle Verlaufuntersuchungen und die wiederholte Gewinnung biologischer Proben an ein und demselben Individuum durchzuführen und damit biologische Parameter in ihrer intra-individuellen Dynamik beurteilen zu können. In diesem Studiendesign haben inter-individuelle Streuungen nur minimalen Einfluss und die Anzahl der erforderlichen Tiere kann aus statistischer Sicht gering gehalten werden.

PARALLELUNTERSUCHUNGEN INNERHALB EINES TIERES REDUZIEREN DIE ANZAHL DER VERSUCHSTIERE

Im Gegensatz zu Nagetiermodellen erlaubt die Verwendung von Nutztieren die gleichzeitige Erhebung funktioneller, entzündlicher und morphologisch-struktureller Veränderungen an einem Tier. Außerdem kann biologisches Probenmaterial (z. B. Blut, broncho-alveoläre Spülflüssigkeit) auch ohne Euthanasie des zu beprobenden Tieres in ausreichender Menge gewonnen werden. Es kann damit nicht nur auf die Verwendung separater Tiergruppen für unterschiedliche Untersuchungsziele verzichtet werden, innerhalb eines Organismus können unterschiedliche biologische Parameter auf gegenseitige Interaktionen geprüft und im systembiologischen Zusammenhang betrachtet werden. In einem derart komplexen Studiendesign wurden in zahlreichen am IMP durchgeführten Studien biologisch bedeutsame Interaktionen zwischen pathologischen und pathophysiologischen Reaktionen des Wirtstieres bei verschiedensten Infektionen von Nutztieren aufgeklärt. Beispiele hierfür sind Infektionen von Schweinen mit *Chlamydia suis* (Sachse *et al.* 2004, Reinhold *et al.* 2008, 2010) oder PRRS-Virus (Wagner *et al.* 2010) sowie Infektionen von Wiederkäuern mit *Mannheimia* bzw. *Pasteurella spp.* (Reinhold *et al.* 2002, Knobloch *et al.* 2010), Chlamydien (Reinhold *et al.* 2008, Ostermann *et al.* 2010), Mykoplasmen (Reinhold *et al.* 2006, Sachse *et al.* 2006) oder Mykobakterien (Soschinka *et al.* 2010, Purkhart *et al.* im Druck).

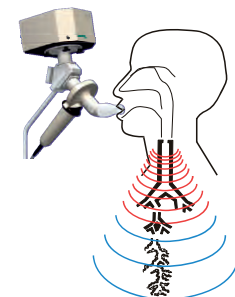
IDENTISCHE DIAGNOSTISCHE VERFAHREN ERLEICHTERN DIE ÜBERTRAGBARKEIT VON ERGEBNISSEN

Am Beispiel der Lungenfunktionsdiagnostik wurde in eigenen Studien nachgewiesen, dass für Tiere mit Körpermassen zwischen 50 und 100 kg (z. B. Kälber, Schweine, Schafe) prinzipiell alle mitarbeitsunabhängigen Verfahren der humanmedizinischen Pneumologie anwendbar sind (Reinhold *et al.* 1996, 1998, 2000, 2010). Somit können bei Mensch und Tier identische Funktionsparameter erhoben werden,

was die Vergleichbarkeit und Interpretation von an unterschiedlichen Spezies erhobenen Daten erleichtert. Die messtechnische Erfassung von Kenngrößen der Lungenfunktion ist am wachen Tier unter Spontanatmung möglich, sodass auch dem Tierschutz weitestgehend entsprochen wird. Am IMP etablierte und für die Anwendung an größeren Tierarten validierte lungenfunktionsdiagnostische Verfahren sind: Spirometrie (Atemvolumina, Atmungsstromstärke, Atemfrequenz unter Ruheatmung), Oszilloresistometrie (Atemwegswiderstände, Lungendehnbarkeit), Kapnovolumetrie (CO₂-Exhalationskurve), diverse Rückatmungsverfahren unter Einsatz von Fremdgasen (Helium, CO), Atemgas- und Atemkondensat-Analysen.

NICHT-INVASIVE UNTERSUCHUNGSMETHODEN VERMINDERN BELASTUNGEN DER VERSUCHSTIERE UND VERBESSERN DIE DATENQUALITÄT

A



Diagnostik
der zentralen
Atemwege

Diagnostik
der Lungen-
peripherie

B



Abb 1: Impuls-Oszilloresistometrie-System (IOS) zur Lungenfunktionsdiagnostik am Menschen (A) und an diversen Großtierarten (B). Dieses nicht-invasive und tierschutzgerechte Lungenfunktionssystem ist im IMP zur Quantifizierung und Differenzierung pulmonaler Dysfunktionen von Kälbern, Schweinen und kleinen Wiederkäuern etabliert.



Funktionelle Untersuchungen der Organsysteme sind bei Nagetieren durch die geringe Körpergröße limitiert. Invasive Techniken sind in Wiederholungs- oder Langzeituntersuchungen kaum einsetzbar.

Nicht-invasive Methoden können zwar wiederholt am selben Tier eingesetzt werden, liefern aber aufgrund messtechnischer Limitationen bei Anwendung an Nagetieren eher globale Parameter mit wenig spezifischem Informationsgehalt. Ein typisches Beispiel hierfür ist der Parameter „Penh“ in der Lungenfunktionsdiagnostik, welcher zwar Veränderungen

im Atmungsmuster reflektiert, aber keine spezifischen Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Obstruktionen zulässt. Bei Großtieren liefern Untersuchungsmethoden aus der Humanmedizin – trotz ihres nicht-invasiven Charakters – spezifische und differenzierende Kenngrößen. Ein Beispiel hierfür ist die in Abb. 1 dargestellte Lungenfunktionsdiagnostik mittels Impuls-Oszilloresistometrie-System, die sowohl eine Unterscheidung zwischen obstruktiven und restriktiven Ventilationsstörungen als auch eine Differenzierung zwischen Obstruktionen der proximalen und der peripheren Atemwege ermöglicht.

	Maus	Mensch	zu empfehlende Literatur
Immunbiologie	Lymphozytäres Blutbild (10-25 % neutrophile Granulozyten; 75-90 % Lymphozyten)	Leukozytäres Blutbild (30-70 % neutrophile Granulozyten; 30-50 % Lymphozyten)	Haley 2003
	keine Defensin-Expression in neutrophilen Granulozyten	neutrophile Granulozyten bilden Defensine (= antimikrobielle Peptide)	Hein & Griebel 2003
	Il8-Gen nicht vorhanden	Interleukin-8 (IL 8) ist bedeutender Faktor in Entzündungsantwort	
	iNOS (inducible NO synthase) Induktion in Makrophagen durch IFN- γ und LPS	iNOS Induktion in Makrophagen nicht durch IFN- γ und LPS, aber durch IFN- $\alpha\beta$, IL-4 ⁺ anti-CD23, (sowie evtl. weitere Zytokine)	Mestas & Hughes 2004
	sowie über 70 weitere Unterschiede zwischen Maus und Mensch in der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Table 1 in Mestas & Hughes 2004)		
hauptsächlichstes Schock-Organ	Darm	Lunge	
Lunge	rechte Lunge: 4 Lappen linke Lunge: 1 Lappen	rechte Lunge: 3 Lappen linke Lunge: 2 Lappen	
Hauptbronchus	~ 1 mm \emptyset	~ 10 – 15 mm \emptyset	
Bronchiolen	~ 0,01 – 0,05 mm \emptyset	< 1 mm \emptyset	
terminale Bronchiolen	~ 0,01 mm \emptyset	~ 0,6 mm \emptyset	
respiratorische Bronchiolen	nicht vorhanden	~ 0,5 mm \emptyset	
Alveolen	~ 0,0039 – 0,0069 mm \emptyset	~ 0,2 – 0,4 mm \emptyset	
BALT (bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe)	BALT deutlich ausgeprägt	BALT kaum vorhanden	
bronchialer Mukus bzw. mukoziliare Clearance	keine submukösen Drüsen distal der Trachea	ca. 80% des Bronchialschleimes werden in Drüsen produziert (nur ca. 20% in Becherzellen)	

Tabelle 2: Beispiele für biologisch relevante Unterschiede zwischen Maus und Mensch

GENETISCHE, MORPHOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE GE- MEINSAMKEITEN ERHÖHEN DIE BIOLOGISCHE RELEVANZ

Die Fülle an Verschiedenheiten zwischen Mensch und Maus lässt berechtigte Zweifel an der Relevanz zahlreicher muriner Tiermodelle aufkommen (Tab. 2).

Die angebliche außergewöhnlich „hohe“ genetische Übereinstimmung zwischen Maus und Mensch ist inzwischen widerlegt. Nur 75 Prozent der murinen Gene und 80 Prozent der menschlichen Gene sind funktional verwandt und stammen von einem gemeinsamen Vorläufer ab (Church *et al.* 2009). Beispielsweise bestehen erhebliche Unterschiede in der genetisch determinierten Regulation von Abwehrmechanismen. So spielt Interleukin-8 (IL 8) bei vielen Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle. Das IL8-Gen fehlt jedoch im Mäusegenom. Es ist dagegen im Genom von Hund, Schwein, Schaf und Rind vorhanden; das kodierte Protein zeichnet sich sogar durch eine hohe Kreuzaktivität zwischen den Spezies aus (Pastoret *et al.* 1998; Hein & Griebel 2003). Das im Jahre 2009 sequenzierte bovine Genom ist dem menschlichen Erbgut ähnlicher als dem Erbgut von Mäusen oder Ratten; rund 80 Prozent der beim Rind identifizierten Gene kommen auch bei anderen Säugetieren vor.

Über den genetischen Hintergrund hinaus sind es die spezifischen Eigenschaften einzelner Organsysteme oder Körperfunktionen, aus denen sich die Eignung (oder auch Nicht-eignung) unterschiedlicher Spezies als "Modell" ableiten lässt. Handelt es sich bei der gewählten Versuchstierspezies um die eigentliche Zielspezies, wie in der Regel in der veterinärmedizinischen Grundlagenforschung gegeben, ist die Eignung des Modells naturgemäß optimal. Strukturelle und physiologische Ähnlichkeiten der Luftwege des Schweines mit denen humaner Luftwege, z. B. im Hinblick auf das Immunsystem (Pabst & Binns 1994; Pabst 1996) oder die Zusammensetzung des epithelialen Oberflächenfilms (Kozlova *et al.* 2005), machen das Schwein aber auch zu einem guten Modell für Lungwegserkrankungen des Menschen. Schweine eignen sich zur Untersuchung von Gentransferereignissen in der Lunge im Rahmen der Entwicklung von Gentherapien bei Lungenerkrankungen wie der zystischen Fibrose (Cunningham *et al.* 2002). Spezies, denen kollaterale Luftwege fehlen (z. B. Schwein, Rind) sind sehr sensibel für die funktionellen Auswirkungen eingeschränkter Luftwegsquerschnitte und damit ein gutes Modell für obstruktive Lungenerkrankungen (Kirschvink & Reinhold 2008). Die Entwicklung der immunologischen Kompetenz während der fetalen Ontogenese und im Neonaten (Immunophysiologie) ist in größeren Tierarten der des Menschen ähnlich. Nutztiermodelle sind für die Erforschung maternal-fetaler Interaktionen und zur Bearbeitung immunologischer Fragestellungen während der Entwicklung *post natum* prädestiniert (Hein & Griebel 2003).

Auch natürlich auftretende Erkrankungen und/oder Infektionen bei Nutztieren sind in Ätiologie und Pathogenese vergleichbaren Erkrankungen des Menschen z. T. sehr ähn-

lich. Typische Beispiele sind die Tuberkulose des Rindes, die RSV (respiratory syncytial virus)-Infektion des Kalbes, durch Rota- oder Noroviren bedingte Darmerkrankungen bei Kälbern oder *Mycoplasma*-Infektionen der Lunge beim Rind.

Ein Schwerpunkt der Forschungstätigkeit im IMP ist die Aufklärung des Einflusses bakterieller Faktoren auf die komplexen Interaktionen des Gesamtorganismus. Hierzu wurden homologe tierexperimentelle Systeme etabliert und werden kontinuierlich weiter entwickelt, in denen der Infektions- und Krankheitsverlauf unter standardisierten Versuchsbedingungen nachempfunden wird. Dabei kommen modernste Methoden der Physiologie, der Pathomorphologie, der Histologie und der Infektionsimmunologie zum Einsatz.

Ein aktuelles Beispiel ist die Etablierung eines Großtiermodells zur Infektion der Lunge mit *Chlamydophila (C.) psittaci* im Rahmen eines nationalen Netzwerkes zur Zoonoseforschung (BMBF-Verbund „Zoonotische Chlamydien“). Das Kalb wurde als Modelltier ausgewählt, weil (1) Rinder natürliche Wirte für diese Infektion darstellen (das zur Infizierung verwendete *C. psittaci*-Isolat stammt aus einem Kalb) und weil (2) die Lunge des Rindes aufgrund ihrer Segmentanatomie besonders geeignet ist, um pulmonale Dysfunktionen widerzuspiegeln (Kirschvink & Reinhold 2008). Somit lassen sich Interaktionen zwischen Erreger und Wirt unter biologisch relevanten Bedingungen untersuchen. Alle bereits genannten Methoden zur nicht-invasiven Lungenfunktionsdiagnostik werden genutzt, um einerseits das Modell zu charakterisieren und andererseits die Konsequenzen der *C. psittaci*-Infektion für die Säugerylunge zu evaluieren. Außerdem bietet dieses Großtiermodell den Vorteil, in intra-individuellen Ansätzen funktionelle, entzündliche, immunologische und morphologisch-strukturelle Veränderungen parallel zu studieren. Aus diesem Großtiermodell werden neue Erkenntnisse für die Relevanz nicht-aviärer *C. psittaci*-Stämme als potenzielle Zoonoseerreger sowie grundlegende Informationen über die Pathogenese chlamydialer Infektionen im Rind erwartet. Der Erkenntnisgewinn dient sowohl der Human- als auch der Veterinärmedizin.

FAZIT

Nutztiermodelle sind ein innovativer Bestandteil der modernen interdisziplinären biomedizinischen Forschung. In der translationalen Medizin und als komparative Modelle ermöglichen sie biologisch relevante Erkenntnisse, die zum Teil sogar dual nutzbar sind (sowohl für den Menschen als auch für die Tiergesundheit). Obwohl sie im Einklang mit dem 3R-Prinzip und den Erfordernissen des Tierschutzes stehen, hat der Einsatz domestizierter Tiere in Modellen im Allgemeinen eine geringere ethische Akzeptanz. Im Vergleich zu Nagetiermodellen sind sie teurer, arbeitsintensiver und zeitaufwändiger. Biologisch relevante Nutztiermodelle – mit der für die jeweilige Fragestellung am besten ge-

eigneten Tierspezies, eingebettet in eine interdisziplinäre Kommunikation und Kooperation zwischen Human- und Veterinärmedizin – besitzen jedoch das größte Potential für Fortschritte im Sinne des „One Health“ Konzeptes.

LITERATUR

HALEY, P.J. 2003. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* 188:49-71.

HEIN, W.R., AND P.J. GRIEBEL. 2003. A road less travelled: large animal models in immunological research. *Nat Rev Immunol* 3:79-84.

IRELAND, J.J., R.M. ROBERTS, G.H. PALMER, D.E. BAUMAN, AND F.W. BAZER. 2008. A comment on domestic animals as dual-purpose models that benefit agricultural and biomedical research. *J Anim Sci* 86:2797-2805.

KIRSCHVINK, N., AND P. REINHOLD. 2008. Use of alternative animals as asthma models. *Current Drug Targets* 8:470-484.

MESTAS, J., AND C.C.W. HUGHES. 2004. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172:2731-2738.

Weitere Literatur kann bei den Verfassern angefordert werden.

Institut für Nutztiergenetik (ING)

SORTNETZ MARIENSEE: ALTERNATIVE ANSÄTZE ZUR GESCHLECHTSSPEZIFISCHEN SELEKTION VON BULLENSPEMIEN

Detlef Rath¹, Ulrike Taylor¹, Wilfried Kues¹, Sabine Klein¹, Birgit Sieg¹, Antje Frenzel¹, Linus Backert¹, Dettmar Frese², Hinrich Osmers², Christina Struckmann², Linda Oberdörfer², Christiane von Tils², Andre Mittag², Christoph Knorr³, Gerd Mönch-Tegeger¹, Annabel Bergmann¹, Stephan Barcikowski⁴, Svea Petersen⁴, Annette Baranski⁴, Alex Heisterkamp⁴, Heiko Meyer⁴, Raoul Lorbeer⁴, Csaba Laszlo Sajti⁴

¹Institut für Nutztiergenetik, ²Masterrind Verden, ³Tierärztliches Institut der Universität Göttingen,

⁴Laser Zentrum Hannover

BEDEUTUNG VON GESEXTEM SPERMA IN DER RINDERZUCHT

Für Produkte, die geschlechtsspezifisch erzeugt werden (z. B. Milch) bzw. vom Geschlecht des produzierenden Tieres beeinflusst werden (z. B. Fleischmenge und Qualität), ist es sinnvoll, eine Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses bei den Nachkommen zu erreichen.

Bei Säugern wird das Geschlecht von den Geschlechtschromosomen (X- oder Y-Chromosom) im Spermium bestimmt. Biotechnische Lösungen, die Spermien einer gewünschten Geschlechtschromosomenart aus einem Ejakulat anzureichern bzw. zu selektieren, werden seit vielen Jahren gesucht. Bislang hat sich ein Verfahren als technisch sicher und praktikabel erwiesen. Hierbei wird der DNA-Gehalt im Spermienkopf, der sich zwischen X- und Y-chromosomalen Spermien geringfügig unterscheidet, als Selektionskriterium verwendet. Mit sog. Hochgeschwindigkeits-Flowzytometern lassen sich rund 10 Millionen Spermien einer Geschlechtsart pro Stunde bei den meisten Nutztierarten sortieren. Allerdings ist der Bedarf an Spermien für eine Besamung sehr tierartabhängig, sodass heute nur beim Rind eine kommerzielle Nutzung ökonomisch sinnvoll ist.

ENTWICKLUNG DES KOOPERATIONSPROJEKTES „SORTNETZ MARIENSEE“

Wesentliche Verfahrensschritte der Spermasortierung wurden in den 1980er und 90er Jahren im United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA, ARS) Beltsville, in der Nähe von Washington entwickelt und durch ein Patent 1990 geschützt, was letztendlich zu einem weltweiten Monopol eines amerikanischen Unternehmens führte. Inzwischen ist das Patent ausgelaufen, aber das Unternehmen hat in einem kompliziert gestalteten Patentnetzwerk weitere Rechte gesammelt, sodass *de facto* ein biotechnisches Monopol entstehen konnte, das zu erheblichen Wettbewerbsverzerrungen führt. Gesextes Sperma kann bislang in Deutschland nicht kommerziell hergestellt

werden. Die Fruchtbarkeit des gesexten Spermas ist deutlich geringer als bei normalem Sperma und preislich zumindest für den deutschen Rinderzuchtmarkt wenig interessant. Entsprechend wurden die erwarteten Absatzmöglichkeiten bei weitem nicht erreicht und liegen nur knapp über 1 Prozent der durchgeführten Besamungen.

In einer langjährigen Kooperation mit dem USDA konnten seit 1989 wesentliche Aspekte der Spermisortierung und der damit verbundenen Biotechniken insbesondere für Ebersperma in Mariensee entwickelt werden. Seit 2000 verfügt das Institut für Nutztiergenetik über eigene technische Einrichtungen zur Spermisortierung. Zunächst wurde in Mariensee Sperma von verschiedenen Nutztierarten (Schwein, Pferd, Schaf) sortiert und speziesindividuelle Sortier- und Konfektionierungsprotokolle entwickelt.

Aufgrund der steigenden Nachfrage nach gesextem Sperma in der Rinderzucht wurde der Forschungsschwerpunkt 2004 auf die Sortierung von Bullensperma gelegt. Wichtiges Ziel war dabei, die Ursachen der Qualitätsminderungen während des Sortierprozesses und die möglichen Risiken für die Besamung zu untersuchen. Parallel begannen Forschungsarbeiten zur Qualitätsverbesserung des Spermas sowie zur technischen Entwicklung von alternativen Teillösungen.

Die Kooperation mit landwirtschaftlichen Betrieben in Norddeutschland wurde ab 2004 für eine praxisnahe Prototypentwicklung eines modifizierten Sortierverfahrens ausgebaut. Das Prototypverfahren sollte nicht mehr den patentrechtlichen Einschränkungen des amerikanischen Monopols unterliegen.

PRINZIP DER SPERMIENSORTIERUNG

Um die Ergebnisse des Forschungsprojektes einordnen zu können, ist es wichtig, die wesentlichen Schritte der Spermisortierung zu kennen. Grundsätzlich handelt es sich bei dem Verfahren um quantitative Flowzytometrie, bei dem die Spermien, die mit einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff zuvor koinkubiert wurden, in einem laminaren Fluss hydrodynamisch fokussiert werden und dann in einem diskontinuierlichen Tröpfchenstrom einen UV-Laserstrahl passieren.

Die Ausrichtung des Spermienkopfes muss dabei orthogonal zum Laserstrahl erfolgen. Es werden zwei emittierte Fluoreszenzsignale mit Photomultipliern (PMT) gemessen. Das 0° Signal der breiten Spermienkopfseite korreliert mit dem DNA Gehalt und wird zur Steuerung der Sortiereinrichtung genutzt, das 90° Signal entstammt dem Spermienkopfrand und ist nicht DNA abhängig. Daher wird dieses Seitensignal zur Triggerung des Sorters verwendet. Die Höhe des 0° Signals regelt die computergesteuerte elektrische Aufladung der Spermien (ca. 180 Volt). Die geschlechtsspezifisch geladenen Tröpfchen reißen nach ihrer Aufladung vom Tröpfchenstrom ab und fliegen frei durch ein elektrostatisches Feld (ca. 3000 Volt). Hier werden sie aufgrund ihrer vordotierten Ladung seitlich abgelenkt und in einer spermienfreundlichen Flüssigkeit aufgefangen. Pro Stunde lassen sich rund 10 Millionen Spermien pro Geschlecht mit einer hohen Reinheit von über 90 Prozent aus dem Ejakulat sortieren.

AUSGEWÄHLTE ERGEBNISSE DER FORSCHUNGSARBEITEN QUALITÄTSVERBESSERUNG DES GESEXTEN SPERMAS

Belastungen für Spermien während des Sortiervorganges gehen im Wesentlichen von vier Quellen aus: 1. Scherkräfte, die während der hydrodynamischen Fokussierung und Passage durch die Orientierungsdüse auf das Spermium einwirken, 2. Die Kombination des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid (Hoechst 33342) in Verbindung mit der Exposition im UV-Licht des Lasers, 3. Die wiederholte elektrische Dotierung entsprechend dem DNA-Gehalt, sowie der anschließenden Passage durch das elektrostatische Ablenkungsfeld. Dazu kommen die Prä- und Postsortierungsbelastungen durch Koinkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff bei Körpertemperatur und die Konservierung bis zur Besamung. Zum Nachweis ultrastruktureller Veränderungen an gesexeten Spermien wurden zunächst 184 Proben, die fraktioniert an 11 verschiedenen Stationen des Sortier- und Aufbereitungsweges entnommen wurden, elektronenmikroskopisch untersucht. Unter der Prämisse, dass eine aus Voruntersuchungen bekannte Motilitätsminderung sortierter Spermien am ehesten durch Schädigungen an den Mitochondrien hervorgerufen wird, konzentrierten sich die Analysen auf das Spermien-Mittelstück. Es fällt eine signifikante Änderung der Mitochondrienkonfiguration bei sortierten Spermien auf, die bei nativen Spermien nicht zu erkennen war. Eine massive Aufweitung der intracrystalen Räume bei gleichzeitiger, erheblicher Matrixkondensation beeinflusst sowohl den Energiehaushalt als auch das „Abwehrverhalten“ der Mitochondrien gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Nach derzeitigem Kenntnisstand sind die beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen primär auf den Einfluss des Hochspannungsfeldes zurückzuführen. Die mitochondrialen Änderungen sind zum Teil reversibel, verringern aber die Lebensdauer der Spermien.

SEXCESS®: ENTWICKLUNG EINES ALTERNATIVEN SORTIER- UND KONSERVIERUNGSPROZESSES

Durch die Optimierung der Flüssigmedienzusammensetzung und des Verarbeitungsprozesses der Spermien wurde die Spermaqualität soweit verbessert, dass nur noch geringfügige Unterschiede zu unsortiertem Sperma bestehen. Bei Sexcess® handelt es sich um ein patentiertes Verfahren zum Sortieren, bei dem die Konservierung entweder bei -196°C in flüssigem Stickstoff erfolgt oder das Produkt in flüssiger Form bis zu 5 Tage einsetzbar ist. Alle Verfahrensstufen vom Anfärben der Spermien über das eigentliche Sortieren bis hin zur Kryokonservierung wurden im Hinblick auf die Verdüner sowie die zeitlichen Abläufe optimiert. So enthalten die Verdüner, mit denen die Spermien vor dem Sortieren in Berührung kommen, sowie die Tiefgefrierverdüner u. a. spezifische Antioxidantien (AO) und Fixatoren. Die AOs schützen die Spermien vor Lipidoxidation, indem sie die schädigenden Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffgruppen (ROS) reduzieren, die einen nachteiligen Effekt auf das Mittelstück des Spermischwanzes haben.

Aktuelle spermatologische Studien bestätigen die positiven Effekte von Sexcess® auf die Vitalität und Integrität geschlechtsspezifisch differenzierter Spermien. Sperma wurde von fünf geprüften Holstein-Friesian-Bullen der Masterrind GmbH gewonnen, nach dem Sortieren eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Qualität wurde mit zugekauftem gesextem Sperma derselben Bullen und unsortierten Kontrollgruppen verglichen. Die Motilität wurde mit einem Computer-assistierten Spermaanalyzergerät (CASA) erfasst. Tabelle 1 zeigt den prozentualen Anteil motiler Spermien direkt vor der Tiefgefrierung (vor TG), direkt nach dem Auftauen (0h) sowie in einem Thermobelastungstest nach drei- und sechsständiger Inkubation bei 37°C, was die Situation im weiblichen Genitale nach der Besamung nachstellt.

	vor TG	0h	3h	6h
Kontrolle	84,4 ± 4,9a	72,9 ± 8,4a	66,4 ± 7,4a	58,8 ± 14,7a
Sexcess	74,0 ± 7,0b	61,9 ± 11,3b	51,2 ± 12,2b	35,0 ± 10,9b
Sexcess FX	78,0 ± 6,9	65,9 ± 5,3	57,9 ± 6,5d	43,9 ± 11,8d
Gesexetes Zukauf-sperma		50,5 ± 5,3b	10,5 ± 6,4c	0,5 ± 0,5c

Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant (p<0,05)

Tabelle 1: Prozentualer Anteil motiler Spermien unmittelbar vor dem Einfrieren sowie 0, 3 und 6h Stunden nach dem Auftauen (repräsentative Daten eines Bullen)

Man geht beim Rind davon aus, dass nach der Insemination zum optimalen Besamungszeitpunkt etwa sechs Stunden vergehen, bis es zur Befruchtung der Eizelle durch das Spermium kommt. Daher ist es wichtig, dass auch nach dieser Zeit noch befruchtungsfähige Spermien zur Verfügung stehen. Durch das Sortieren von Bullensperma nach dem Sexcess®-Protokoll kann insbesondere nach sechsstündiger Inkubation bei 37°C unter Laborbedingungen eine deutliche Qualitätssteigerung in Bezug auf Vitalität und Integrität der Spermienzellen gegenüber gesextem Zukauf sperma beobachtet werden. Die Energieeinsparung durch die chemische Immobilisierung vor und während des Sortierens mit Sexcess FX® führte zu einer zusätzlichen Qualitätssteigerung in Bezug auf die Motilität der Spermien. Vergleichbare Vorteile wurden auch für flüssigkonserviertes Sperma erreicht. Die Besamung mit gesextem Frischsperma konnte in Mariensee mit dem herkömmlichen Sortierverfahren erstmals realisiert werden. In Feldversuchen in Norddeutschland wurden damit Non-return-Raten von rund 60 Prozent erreicht.

ALTERNATIVEN ZUR SORTIERUNG IM ELEKTROSTATISCHEN FELD: LASERABLENKUNG

Als Alternative zur elektrostatischen Spermienablenkung wurde ein Verfahren entwickelt, das durch induzierte Photovaporisation die nicht gewünschten Spermien sowie die nicht eindeutig identifizierbaren Tröpfchen seitlich ablenkt. Durch einen Laserstrahl, der nicht in Tropfen eindringen kann, wird ein Impuls auf die Tropfenoberfläche gesetzt, der den Tropfen aus seiner geraden Flugbahn ablenkt. Tropfen mit den gewünschten Spermien werden nach ihrer Erken-

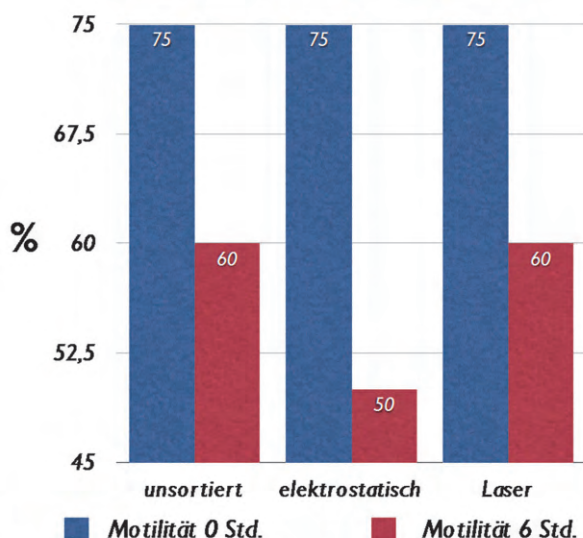


Abb 1: Motilitätsvergleich von gesexten Bullenspermien nach konventioneller elektrostatischer Ablenkung und nach Laser-Photovaporisation und anschließender Inkubation für 6 Std. bei 38°C

nung durch den UV Laser nicht abgelenkt und unbelastet im Auffangmedium gesammelt. Die Vorrichtung lässt sich an einem normalen Flowzytometer betreiben und beeinflusst die Qualität der bevorzugten Spermienpopulation nicht mehr. Entsprechend sind Motilität und Morphologie der Spermien auch im Belastungstest nicht mehr von ungesortetem Sperma zu unterscheiden. Die Vorrichtung wurde zum Patent angemeldet (Abb.1) und wird zurzeit auf ihre Einsatztauglichkeit überprüft.

MARKIERUNG OHNE FLUORESCENZFARBSTOFF: FUNKTIONALISIERTE GOLDNANOPARTIKEL (GNP) ALS MARKER

Der bislang verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist in Kombination mit energiestarken Anregungsquellen wie einem UV-Laser als kritisch zu betrachten. Lediglich durch die sehr kurzfristige Exposition vor dem Laser werden die Spermien wenig geschädigt. Allerdings verbleibt der Farbstoff nach der Sortierung in den Spermien und wird in die zu befruchtende Oozyte und damit in den Embryo transportiert. Weiterer Nachteil des bisherigen Färbeverfahrens ist seine Unspezifität. Es werden alle Chromosomen im Spermienkopf angefärbt und nur der relative DNA-Unterschied zwischen den Spermien gemessen. Im Hinblick auf die Sortierreinheit und zur Verringerung der Belastung des Spermiums wäre es vorteilhaft, eine Gensonde zur Identifizierung von Y-Chromosom-spezifischen DNA Sequenzen im Spermienkopf einzusetzen, die ein eindeutiges Signal erzeugt, das absolut geschlechtsspezifisch ist. In einem Teilprojekt des Sorternetzprojektes wurde daher untersucht, ob durch funktionalisierte Gold-Nanopartikel diese Aufgabe erfüllt werden kann. Dazu mussten folgende Verfahren etabliert bzw. an die Bedingungen der Spermienphysiologie adaptiert werden:

1. Erzeugung von Goldnanopartikeln ohne toxische chemische Substanzen
2. Entwicklung eines Nachweisverfahrens für GNP
3. Penetration durch die Spermienmembranen
4. Multifunktionalisierung von GNP mit Y-spezifischen DNA Sonden
5. Identifizierung geeigneter Gensonden
6. Nachweis der toxikologischen Unbedenklichkeit für Gameten und Embryonen

Die Herstellung von GNP sehr homogener Größe ohne die Verwendung toxischer Chemikalien wurde im Laserzentrum Hannover entwickelt. Durch patentierten Laserabtrag von Goldfolie lassen sich stabile, genau definierte Größenklassen von GNP erzeugen, die noch während ihrer Erzeugung funktionalisiert werden können.

Das Imaging von Nanopartikeln im biologischen System konnte in Mariensee mittels konfokaler Mikroskopie etabliert werden. In einer systematischen Studie wurden Einzelpartikel bzw. Agglomerate ab einer Größe von 60 nm sowohl extra- als auch intrazellulär zuverlässig visualisiert.

Um darüber hinaus ein Detektionsverfahren für Nanopartikel-markierte Spermien im Hochgeschwindigkeitsflowzytometer zu entwickeln, wurden zunächst nicht funktionalisierte GNP in einem modifizierten Flowzytometer getestet. Dabei konnte ein Geräteaufbau etabliert werden, der simultan sowohl die von den Partikeln ausgehende Lichtstreuung als auch die Lichtabsorption misst. Bei dem neuen Setup liegt die Detektionsgrenze von 10 nm großen GNP derzeit bei 12 µg/mL. Dies zeigt, dass die Detektion von GNP in der Hochgeschwindigkeitsflowzytometrie zur Spermien-sortierung prinzipiell möglich ist.

Bisher wurden Gensonden zur Hybridisierung und damit Markierung von bestimmten Genabschnitten nur an fixierten Zellen eingesetzt. Während dort die Ziel-DNA vor der Hybridisierung denaturiert wird, ist in lebenden Zellen eine Sonde nötig, die eine Sequenz im intakten Doppelstrang erkennt. Daher musste eine Oligonukleotid-Sonde entwickelt werden, die mittels Triplex-Hybridisierung und in Verbindung mit funktionalisierten Nanopartikeln für die Detektion einen Abschnitt des bovinen Y-Chromosoms markiert. Dazu erschien ein Locked Nucleic Acid (LNA)-Oligonukleotid am erfolgversprechendsten. Der prinzipielle Funktionsnachweis dafür konnte bereits erbracht werden. Dazu wurde ein Pool von LNA-Sonden mit geeigneten Y-chromosomspezifischen Basensequenzen genutzt. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass eine Dekondensierung des Spermienchromatins, wie im Rahmen von Duplex-Hybridisierungen üblich, bei Triplex-Hybridisierung nicht notwendig ist. Dies ist essentiell, damit die Spermien ihre volle Funktionsfähigkeit und DNA-Integrität beibehalten. Somit konnten zwei wichtige Punkte, die eine *In-vivo*-Hybridisierung von Spermien bisher stark limitierten, gelöst und die prinzipiellen technischen Voraussetzungen für ein qualitatives Sortierverfahren etabliert werden.

Im nächsten Verfahrensschritt war nachzuweisen, dass GNP die intakten Spermienmembranen penetrieren können. Bei Untersuchungen mit Oligonukleotid- oder Penetratin-konjugierten GNP an einer somatischen bovinen Zelllinie wurde die Aufnahme für beide Partikel-Konjugate intrazellulär erreicht, wobei Oligonukleotid-Konjugate frei im Zytosol vorlagen, während Penetratin-Konjugate endosomal aufgenommen wurden. Bei Spermien hingegen zeigten die Penetratin-konjugierten GNP lediglich eine Bindung an die Zelloberfläche, während Oligonukleotid-konjugierte GNP nach zwei Stunden innerhalb der Membranstrukturen lokalisiert waren, ohne allerdings die Membran überwunden zu haben. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass für eine zügige Internalisierung eine Bi-Funktionalisierung der GNP mit einem zellpenetrierenden Peptid (CPP) neben der Oligonukleotidsonde unumgänglich ist. Da das CPP Penetratin dafür allerdings nicht der geeignete Kandidat zu sein schien, wurden als Alternativen „Tat-Protein“ und „Deca-Arginin“ getestet. Für diese Versuche wurden die Partikel

in situ mit einer LNA-Oligonukleotid-Sonde konjugiert und *ex situ* mit einem der beiden CPP verbunden. Während der Untersuchungen erwies sich die Kombination LNA/Deca-Arginin als effektive Variante für ein Einschleusen der Nanopartikel durch die Plasmamembran. Weiterhin konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Membranpenetration ein Partikeldurchmesser von max. 10 nm und ein hoher Grad an Monodispersität sind.

Wichtig ist für den Einsatz von GNP im Befruchtungsprozess, dass Gameten und Embryonen keinen toxischen Effekten der GNP unterliegen. Im Rahmen von toxikologischen Untersuchungen konnte sowohl bei somatischen Zellen als auch bei Spermien bis zu einer Gold-Konzentration von 50 µM keine schädigende Wirkung festgestellt werden. Ab 50 µM waren negative Effekte erkennbar. Diese Konzentration ist allerdings um ein Vielfaches höher als für die Zellmarkierung erforderlich. Deutlich höhere GNP-Konzentrationen von 250 µM, die in einem Volumen von 10 pL in Embryonen mikroinjiziert wurden, zeigten im Vergleich zur Injektionskontrolle keinen negativen Einfluss auf die embryonale Entwicklungskompetenz.

Insgesamt wurden in dem Forschungsprojekt zahlreiche neue Ansätze zur Spermientrennung und Verbesserung der Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen aufgezeigt. Der Transfer vom wissenschaftlichen Stadium des Forschungsprojektes in den praktischen Ablauf einer Besamungsstation wird für Teilbereiche bis Ende des kommenden Jahres abgeschlossen sein. Zurzeit wird in Feldstudien die Anwendbarkeit überprüft.

Literatur kann bei den Verfassern angefordert werden.

Institut für Immunologie (IfI)

DIE ENTWICKLUNG VON DER PEPTIDVAKZINE ZUR DNA-VAKZINE

Eberhard Pfaff

Zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten hat die Prävention mittels Impfung eine überragende Bedeutung. Hierbei werden Organismen mit antigenen Strukturen entsprechender Pathogene behandelt, sodass das Immunsystem einen wirksamen Schutz gegen das entsprechende Pathogen aufbauen kann.

Neben klassischen Impfstoffen wie inaktivierten Pathogenen oder bezüglich ihrer Pathogenität abgeschwächten Pathogenen kamen in den letzten Jahrzehnten neue Impfstoffe wie sogenannte Subunitvakzine, Peptidvakzine und gentechnisch veränderte Pathogene als Impfstoffe zur Anwendung.

Im Einzelnen können die notwendigen Antigene auf verschiedene Weise bereitgestellt werden.

1. Durch Anwendung von lebenden attenuierten Viren, die ausgehend vom Wildtypvirus durch mehrmalige Zellpassagen in Zellkultur gewonnen werden. Die so erhaltenen Virusstämme zeigen eine massive Reduktion ihrer Virulenz.
2. Durch Inaktivierung der virulenten Viren über Behandlung mit verschiedenen Chemikalien.
3. Durch gezielte Mutagenese der virulenten Viren, wobei ebenfalls attenuierte Viren entstehen.
4. Durch Einsatz sogenannter Vektorvakzine. Dabei werden die Gene der immunologisch relevanten Antigene in virale Vektoren eingebracht.
5. Durch Anwendung sogenannter Subunitvakzine. Hierbei werden Antigene, die für die Immunantwort gegenüber den entsprechenden Viren wichtig sind, durch Produktion in pro- oder eukaryotischen Expressionssystemen gewonnen.
6. Durch Einsatz von vollsynthetisch hergestellten Peptiden. Hierbei werden antigene Determinanten von immunologisch wichtigen Proteinen durch kurze Peptide simuliert.
7. Durch Immunisierung mit Nukleinsäuren.

Die meisten heute angewendeten Impfstoffe, welche zur Prävention viraler Infektionskrankheiten eingesetzt werden, basieren nach wie vor auf attenuierten lebenden Viren. Da sich diese Viren in den entsprechenden geimpften Spezies vermehren können, induzieren diese ebenfalls das gesamte Spektrum der Immunabwehr. Inzwischen ist auch die molekulare Grundlage aller eingesetzten Lebendvakzine weitgehend untersucht. Hierbei zeigte es sich zum Beispiel bei der Polivirusvakzine, dass wenige Mutationen im nicht-

translatierten Genombereich für die Attenuierung verantwortlich sind. Durch hohe Mutationsraten bei RNA-Viren besteht deshalb die Gefahr, dass während der Vermehrung des Impfvirus im Organismus wieder hochvirulente Revertanten gebildet werden. Einen Ausweg können hier auch die oben angeführten Vektorvakzine bieten, da diese auf Basis von DNA-Viren eine deutlich höhere Stabilität aufweisen. Revolutionär ist in diesem Kontext natürlich die Entwicklung einer neuen Klasse von Impfstoffen auf Basis von DNA oder RNA. Diese Vakzine-DNAs bestehen aus einem eukaryotischen Expressionsvektor, in den die jeweiligen für die Erregerabwehr notwendigen Gene integriert sind. Nach Transfer dieser Expressionsplasmide in Zellen werden die entsprechenden Erregergene exprimiert und dem Immunsystem präsentiert. Diese verhalten sich im Organismus wie virulente Viren, indem sie dem Immunsystem virusinfizierte Zellen vortäuschen und so ebenfalls das komplette Reservoir der humoralen und zellulären Immunantwort induzieren. Ein großes Problem bei der DNA-Vakzinierung bleibt aber die effiziente Applikation in den Organismus. Neben verschiedenen Injektionsstrategien wird deshalb vermehrt versucht, DNA auch verpackt in Partikel für den Transfer zu verwenden.

Im Folgenden soll gezeigt werden, wie die Entwicklung einer Peptidvakzine gegen das Maul- und Klauenseuchevirus (MKSV) erfolgt ist. Dabei soll auch das Potenzial dieser Vakzinierungsmethode demonstriert werden. Im Vergleich hierzu soll die Entwicklung einer DNA-Vakzine gegen das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) dargestellt werden. Diese Betrachtungen sollen auch einige Entwicklungen aufzeigen, die in der Impfstoffforschung seit ungefähr dreißig Jahren abgelaufen sind.

Das Maul- und Klauenseuchevirus gehört zu den Picornaviren und infiziert Paarhufer. Die Infektion führt zu einer ersten, aber selten tödlich verlaufenden Krankheit, wobei vor allem der wirtschaftliche Schaden sehr hoch ist. Für Vakzineentwicklungen wichtig sind die Strukturproteine VP1 – VP4. Von diesen Strukturproteinen ist vor allem das VP1 von Interesse, da die hauptantigene Determinante auf diesem Protein lokalisiert ist. Deshalb ist es notwendig, solche Aminosäuresequenzen innerhalb des VP1 zur Synthese von Peptiden auszusuchen. Verschiedene Methoden wurden zur Identifizierung solcher Sequenzen angewendet und führten zur Identifizierung eines Hexadecapeptids innerhalb des VP1.



Diese Methoden waren

1. Die Vorhersage der Sekundärstruktur von VP1. Um eine starke und spezifische Immunantwort gegen das Peptid und letztendlich gegen das Virus zu erreichen, sollte die native Konformation einer entsprechenden Region im Protein so stabil wie möglich sein. Ein großer Beitrag zur Proteinestabilität wird von Wasserstoffbrückenbindungen geleistet. In einem kurzen Peptid werden eine große Anzahl solcher Wasserbrückenbindungen bei einer α -helikalen Struktur ausgebildet. Deshalb sind Aminosäuresequenzen, welche eine α -helikale Struktur im nativen Protein ausbilden, sehr gute Kandidaten.
2. Analyse von hochvariablen Aminosäuresequenzen im Protein. Viele Viren zeigen ein hohes Maß antigener Variation und es ist nachvollziehbar, dass Regionen mit

hoher Sequenzvariabilität identisch mit Regionen von immunologischer Relevanz sein können. Sequenzanalysen verschiedener Sub- und Serotypen zeigten in VP1 eine hochvariable Region, welche zum Teil durch das Peptid A (Abb.1) abgedeckt ist.

3. Lokalisierung immunogener Proteinfragmente. Mögliche immunogene Sequenzen konnten im carboxy-terminalen Drittel von VP1 durch eine immunologische Analyse großer Proteinfragmente, die durch Spaltung von VP1 erhalten wurden, gefunden werden.

Wie in Abb. 1 gezeigt, führten alle dargelegten Methoden zur Lokalisierung der hauptantigenen Determinante zu einer Region in VP1, welche die Aminosäuren 144 - 159 umfasst.

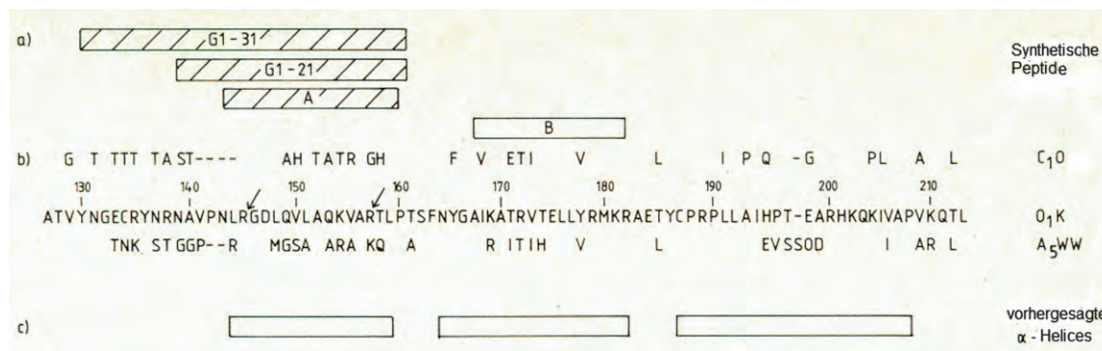


Abb 1:

Strukturelle und serologische Analyse des carboxy-terminalen Bereichs des MKSV – Hüllproteins VP1.

a) Synthetische Peptide, welche in dieser Studie verwendet wurden. Nur die gestrichelten Peptide induzierten neutralisierende Antikörper.

b) Nur Aminosäureaustausche zur O₁K - Sequenz sind angegeben. Striche stehen für Deletionen, die zur Optimierung des Sequenzvergleichs eingeführt wurden. Die Pfeile markieren die Trypsinspaltstellen, welche auf dem Virion exponiert sind.

c) Sequenzen, deren Konformation im Protein als α -helikal vorhergesagt wurden.

Da kleine Peptide in der Regel keine Antikörper induzieren können, ist es notwendig, diese an "Carriermoleküle" zu koppeln. Um eine optimale Immunisierungsstrategie zu ent-

wickeln, wurden hier in einem ersten Schritt verschiedene Carrierproteine ausgetestet (Tab.1). Im ELISA zeigte sich dabei, dass gegen das Peptid A die höchsten Antikörpertiter

	Peptid A – konjugiert mit				Peptid A	
	BSA	Thyr	TT	KLH	Polymerisiert	Freies Peptid
Peptid A	1.8	2.0	2.5	3.2	< 0.3	< 0.3
Peptid B	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3
VP1/O ₁ K	1.6	2.0	2.4	3.3	< 0.3	< 0.3
VP2/O ₁ K	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3
VP3/O ₁ K	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3
O ₁ K-Virus	1.8	2.1	3.0	3.8	< 0.3	< 0.3

Werte sind $-\log_{10}$ der Serumverdünnung. BSA: bovines Serumalbumin; Thyr: bovines Thyroglobulin; TT: Tetanustoxoid; KLH: Keyhole limpet Hemocyanin

Tabelle 1: Reaktivität der anti-Peptid A Antiserum induziert durch verschiedene Konjugate.

induziert werden, wenn es an das "keyhole limpet hemocyanin" (KLH) gekoppelt ist. Eine Reaktion der anti-Peptidantikörper konnte sowohl gegen das isolierte VP1 als auch gegen das komplette MKS-Virus nachgewiesen werden. Von großer Bedeutung war der Nachweis von virusneutralisierenden Antikörpern, die durch das Peptid A induziert wurden. In einem Serumneutralisationstest konnte gezeigt werden, dass die anti-Peptidantikörper, die gegen das Konjugat von Peptid A an KLH gebildet wurden, eine spezifische Neutralisation des infektiösen MKS-Virus erlauben (Tab.2).

Serum induziert durch	Serum Neutralisationstest gegen MKSV - Serotyp		
	O ₁ K	C ₁ O	A ₅
Peptid A/Thyroglobulin	2.7	2.1	< 0.3
Peptid A/Tetanustoxoid	3.1	2.2	< 0.3
Peptid A/KLH	3.6	2.5	< 0.3

Tabelle 2: Neutralisation des MKSV durch verschiedene anti-Peptid-Antisera und Test der Kreuzreaktivität mit verschiedenen Serotypen.

Als zusätzliche Kontrolle wurde hier ein klassischer Impfstoff eingesetzt, der zeigt, dass Antikörper gegen das Peptid A ursächlich für die Virusneutralisation sind. Ein weiterer wichtiger Schritt ist der Nachweis, dass die *in vitro* erhaltenen Daten bezüglich der Virusneutralisation mit dem tat-

Tier Nr.	Menge an injiziertem Peptid (KLH-gekoppelt) [µg]	Neutralisierender Antikörpertiter	Schutz vor MKSV - Infektion nach Belastung
1	100	1:45	+
2	100	1:11	+
3	100	1:30	+
4	100	1:34	+
5	100	1:34	+
6	10	1:23	+
7	10	1:30	+
8	10	1:7.5	+
9	10	1:23	+
10	10	1:7.5	+

Tabelle 3: Abhängigkeit des Antikörpertiters und des Impfschutzes von der Peptidmenge.

sächlichen Schutz von Tieren durch eine Immunisierung mit dem an KLH gekoppelten Peptid A einhergehen. Hierzu wurden Hamster mit zwei unterschiedlichen Men-

Inokulierte Peptidkonjugate	ELISA Titer (- log ₁₀) gegen (Serumpool)			Neutralisationstiter (Serumpool)	Anzahl der geschützten/immunisierten Tiere
	Peptid	VP1	Virus		
A/KLH/Glu/FCA	4.0	2.5	2.7	1:45	4/4
G1-21/KLH/Glu/FCA	4.4	1.5	2.7	1:45	4/4
G1-31/KLH/Glu/FCA	3.8	2.0	3.0	1:13	3/4
A/KLH/CDI/FCA	2.6	1.0	1.1	1:3	3/3
G1-21/KLH/CDI/FCA	1.6	1.0	1.0	1:3	3/3
G1-31/KLH/CDI/FCA	2.3	1.0	1.0	1:3	0/2
A/KLH/Glu/Al(OH) ₃	2.2	1.1	1.0	< 1:3	0/3
G1-21/KLH/Glu/Al(OH) ₃	2.4	1.5	1.2	1:6.5	1/4
G1-31/KLH/Glu/Al(OH) ₃	2.4	1.4	1.3	1:5.7	0/4
KLH/Glu/FCA	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 1:3	0/4
KLH/Glu/Al(OH) ₃	< 0.3	< 0.3	< 0.3	< 1:3	0/4

KLH: Keyhole limpet Hemocyanin; Glu: Kopplung mit Glutardialdehyd; CDI: Kopplung mit wasserlöslichem Carbodiimid; FCA: Freund's Complete Adjuvanz; Al(OH)₃: Aluminiumhydroxid als Adjuvanz

Tabelle 4: Antikörperantwort gegen verschiedene synthetische Peptide aus dem VP1 des MKSV - Stamms O₁K in Meerschweinchen.

gen des Konjugats immunisiert und diese nach zweimaliger Injektion einer Belastungsinfektion mit MKSV Typ O₁ unterzogen (Tab. 3).

Wie aus der Tabelle ersichtlich konnten sehr unterschiedliche individuelle neutralisierende Antikörpertiter in den immunisierten Tieren gefunden werden. Jedoch zeigte sich, dass alle Tiere vor der MKSV-Infektion geschützt waren.

Vergleicht man die Aminosäuresequenz verschiedener MKSV Sub- und Serotypen, so kann man feststellen, dass das Peptid A Teil einer hoch variablen Region zwischen Aminosäure 130 und 159 im Hüllprotein VP1 ist (Abb. 1). Aus diesem Grund wurden zwei weitere Peptide (G1-21 und G1-31) getestet, die einen größeren Bereich dieser hypervariablen Region repräsentieren. Die Peptide wurden jeweils mittels verschiedener Chemikalien an KLH gekoppelt, um eine Aussage über die beste chemische Methode für die Kopplung zu erhalten. Des Weiteren wurden zwei unterschiedliche Adjuvanzen eingesetzt. Nach Immunisierung von Hamstern konnte gezeigt werden, dass die längeren Peptide keine besseren Ergebnisse bei Neutralisationstiter und Schutzrate nach Belastungsinfektion erbrachten. Jedoch ist zu sehen, dass Kopplungsmethode und verwendetes Adjuvans von wesentlicher Bedeutung sind. Tab. 4 fasst die Ergebnisse zusammen.

Um einen effektiven Schutz von Tieren vor einer MKSV-Infektion zu gewährleisten, sollte jede Vakzine in der Lage sein vor Isolaten desselben Subtyps, aber auch möglichst anderen Subtypen und/oder Serotypen zu schützen. Deshalb wurden die erhaltenen anti-Peptidseren gegen eine Reihe von Sero- und Subtypen von MKSV getestet.

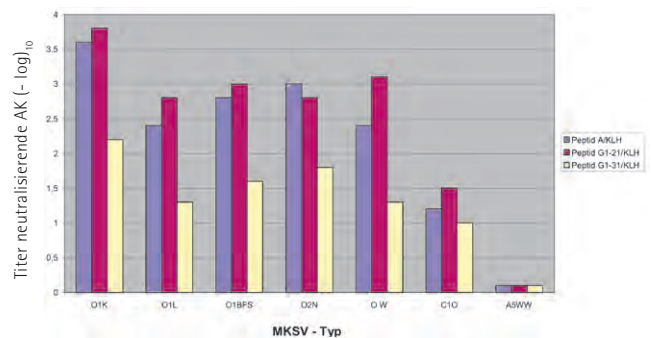


Abb 2: Neutralisation verschiedener Serotypen, Subtypen und Isolate von MKSV durch anti-Peptid-Antiseren

Abb. 2 zeigt, dass Antikörper, die mittels Immunisierung mit den drei Peptiden (A, G1-21, G1-31) erhalten wurden, in der Lage sind, alle getesteten Isolate des Subtyps O₁ zu neutralisieren. Darüber hinaus konnten auch andere Subtypen wie O₂ oder nicht subklassifizierte O-Serotypen inaktiviert werden. Auch der Serotyp C₁₀ war im Gegensatz zu A_{5W} inaktivierbar.

Eine Erklärung für diese Resultate können in Abb. 3 gefunden werden. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der verschiedenen MKSV-Viren zeigt sich, dass im hochvariablen Bereich eine zwischen Serotyp O und Serotyp C konservierte Sequenz RGDL zu finden ist, während das nichtreaktive A₅-Virus an dieser Stelle nur drei konservierte Aminosäuren (RGD) besitzt. Da bekannt ist, dass Epitope vier bis sechs Aminosäuren für die Erkennung benötigen, ist dieses Resultat dadurch sehr gut erklärbar.

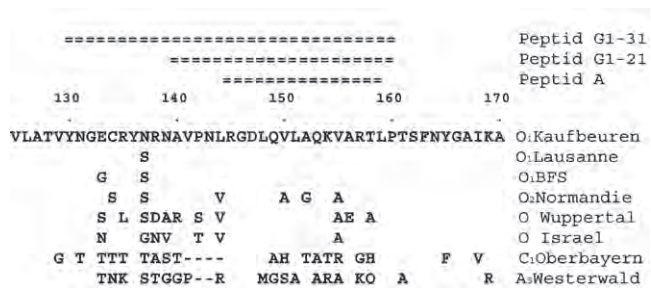


Abb 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen der hauptantigenen Determinante im VP1 verschiedener MKSV-Stämme und -Serotypen. Es werden nur die Aminosäureaustausche zur O₁K-Sequenz dargestellt. Striche stellen Deletionen dar, die für ein optimales Alignment eingefügt wurden. Die Lokalisation der in dieser Studie verwendeten Peptide wird ebenfalls gezeigt.

Ein unkonventioneller Ansatz zur Entwicklung von Vakzinen basiert auf der Anwendung von Nukleinsäuren, um eine Immunantwort gegen ein Pathogen zu erzeugen. Hier ging es um die Frage, ob die heute angewendete Impfung von Schweinen mit einer Subunitvakzine auf Basis eines rekombinanten E₂-Proteins durch die Entwicklung einer so genannten DNA-Vakzine noch verbessert werden kann. Bei CSFV ist die zentrale Immunantwort, die für den Schutz vor Infektionen wichtig ist, gegen das virale Hüllprotein E₂ gerichtet. Um eine verstärkte Immunantwort einer E₂-DNA-Vakzine im Schwein zu generieren, wurden wie für andere Spezies schon beschrieben Zytokingene zur Co-Expression dieser immunstimulatorischen Moleküle eingesetzt. Hier kamen IL12 als Induktor für eine IFN- γ Expression in NK-Zellen und einer starken TH₁-Immunantwort, IL18 als Stimulator sowohl der TH₁ als auch der TH₂-Immunantwort und CD40L als Stimulator für die T-Zell-abhängige Antikörperantwort in Frage.

Das Gen des CSFV-Hüllproteins E2 wurde in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pcDNA4HisMax) integriert (Abb. 4A). In einer separaten Transkriptionseinheit wurden im selben Plasmid die porzinen Gene für IL12 (beide Ketten P40 und P35, getrennt durch eine IRES-Sequenz, welche die unabhängige Expression beider Proteinketten erlaubt), IL18 und CD40L inseriert (Abb. 4B)

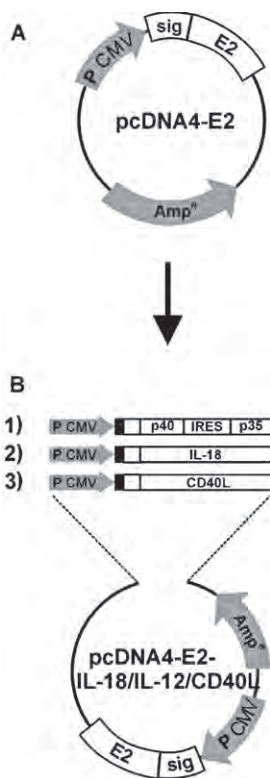


Abb 4: Das E2-Gen des CSFV-Stamms "Alfort" wurde in das Plasmid pcDNA4HisMax inseriert (A). Zusätzlich wurden separate Transkriptionseinheiten, die für die porzinen Zytokine IL12 (1), IL18 (2) und CD40L (3) kodieren, in das pcDNA4-E2 inseriert (B).

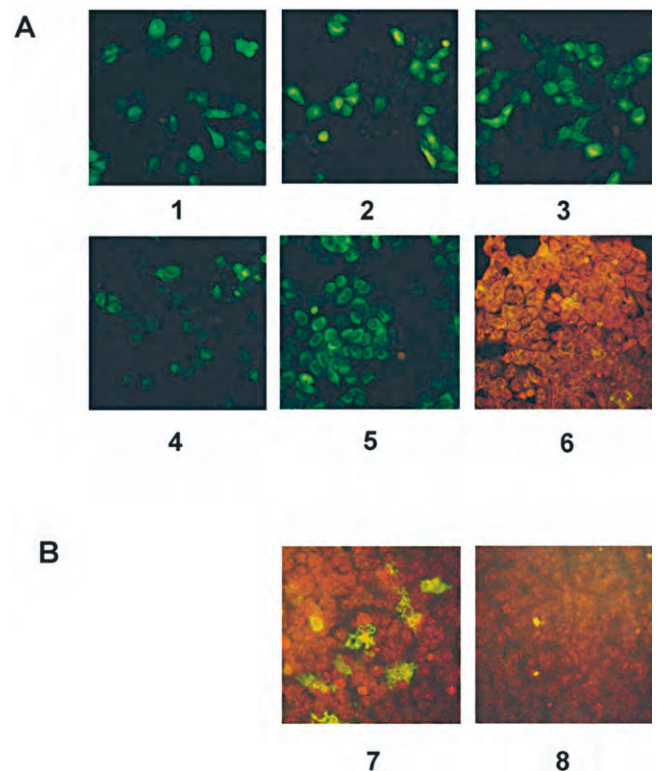


Abb 5: Immunfluoreszenzanalyse der transfizierten Zellen. (A): Transfektion mit pcDNA4-E2 (1), pcDNA4-E2-IL12 (2), pcDNA4-E2-IL18 (3) und pcDNA4-E2-CD40L (4). Als positive Kontrolle wurden Zellen mit CSFV infiziert (5). Als negative Kontrolle sind die Zellen ohne Inkubation gezeigt (6). Der Nachweis wurde mit einem monoklonalen anti-E2-Antikörper geführt. (B): Nachweis der Expression des CD40L mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen den humanen CD40L (7) und negative Kontrolle (8).

Die Expression des E2-Gens und des porzinen CD40L wurden durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierzu wurden die Plasmide in porzine MAX-Zellen transfiziert und die Expression mittels spezifischer monoklonaler Antikörper nachgewiesen. Abb. 5 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse.

Aufgrund der Tatsache, dass spezifische Antikörper gegen porzines IL12 und porzines IL18 nicht vorhanden waren, wurde die Expression von IL12 und IL18 mittels eines biologischen Tests nachgewiesen. Hierzu wurden NK-Zellen mit den Überständen von Zellen inkubiert, welche mit pcDNA4-E2-IL12 oder pcDNA4-E2-IL18 transfiziert wurden.

Abb. 6 A zeigt eine Stimulation der NK-Aktivität durch den Überstand von mit pcDNA4-E2-IL12 transfizierten Zellen, wogegen der Überstand von mit pcDNA4-E2 transfizierten Zellen als Negativkontrolle eine deutlich geringere Aktivierung zeigt. Die gemessene Aktivierung durch das exprimierte IL12 ist sogar vergleichbar mit der Aktivierung durch IL12 haltige Überstände, die durch Infektion von Zellen mit einem IL12 exprimierenden rekombinanten Adenovirus infiziert wurden. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch im Fall des Nachweises von IL18 beobachtet (Abb. 6 B).

Die beschriebenen Expressionsplasmide wurden im Tier auf ihre Fähigkeit getestet, einen Schutz vor einer CSFV-Infektion hervorzurufen. Hierzu wurde jeweils eine Gruppe mit vier Schweinen insgesamt dreimal mit den verschiedenen Expressionsplasmiden immunisiert. Zwei Schweine wurden nur mit dem leeren Expressionsvektor immunisiert und dienten als positive Kontrolle bei der Belastungsinfektion. Achtzehn Tage nach der zweiten Boosterimmunisierung wurden alle Schweine einer Belastungsinfektion mit einer für Schweine letalen Dosis von 105 TCID₅₀ des hochvirulenten CSFV-Stamms Eystrup unterzogen. Anschließend wurde täglich die Temperatur kontrolliert (Abb. 7) und auf eventuell auftretende klinische Symptome geachtet.

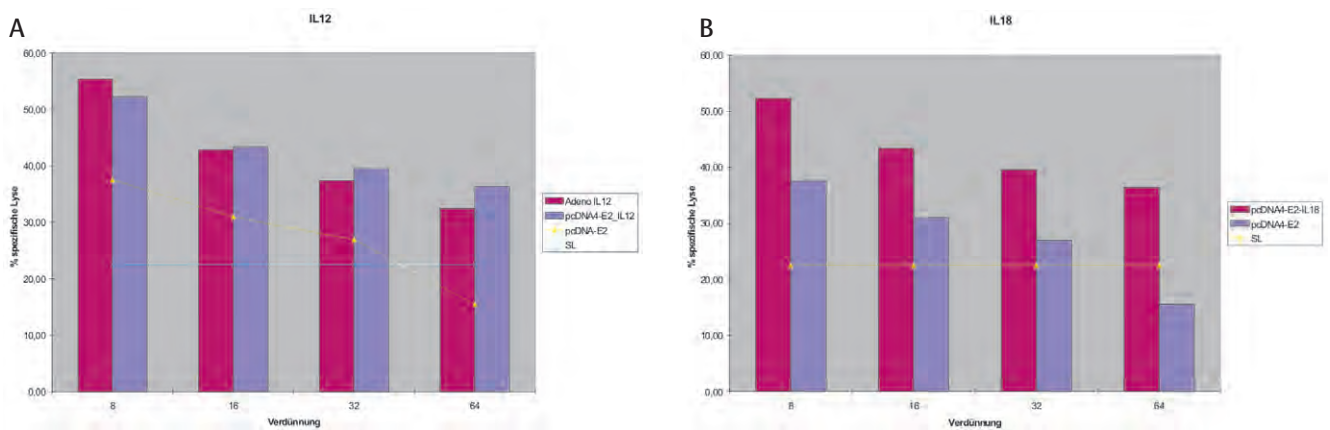


Abb 6: Dosisabhängige Erhöhung der NK-Aktivität bei Inkubation mit IL12 (A) bzw. IL18 (B). PBMC wurden mit Medium (SL) oder verschiedenen Verdünnungen des Überstands der mit pcDNA4-E2-IL12 oder pcDNA4-E2-IL18 transfizierten Zellen inkubiert und die spezifische Lyse von Indikatorzellen (K562-Tumorzellen) gemessen. Überstände von pcDNA4-E2 transfizierten Zellen und von Zellen, die mit einem rekombinanten IL12 exprimierenden Adenovirus infiziert wurden, dienen als Kontrolle.

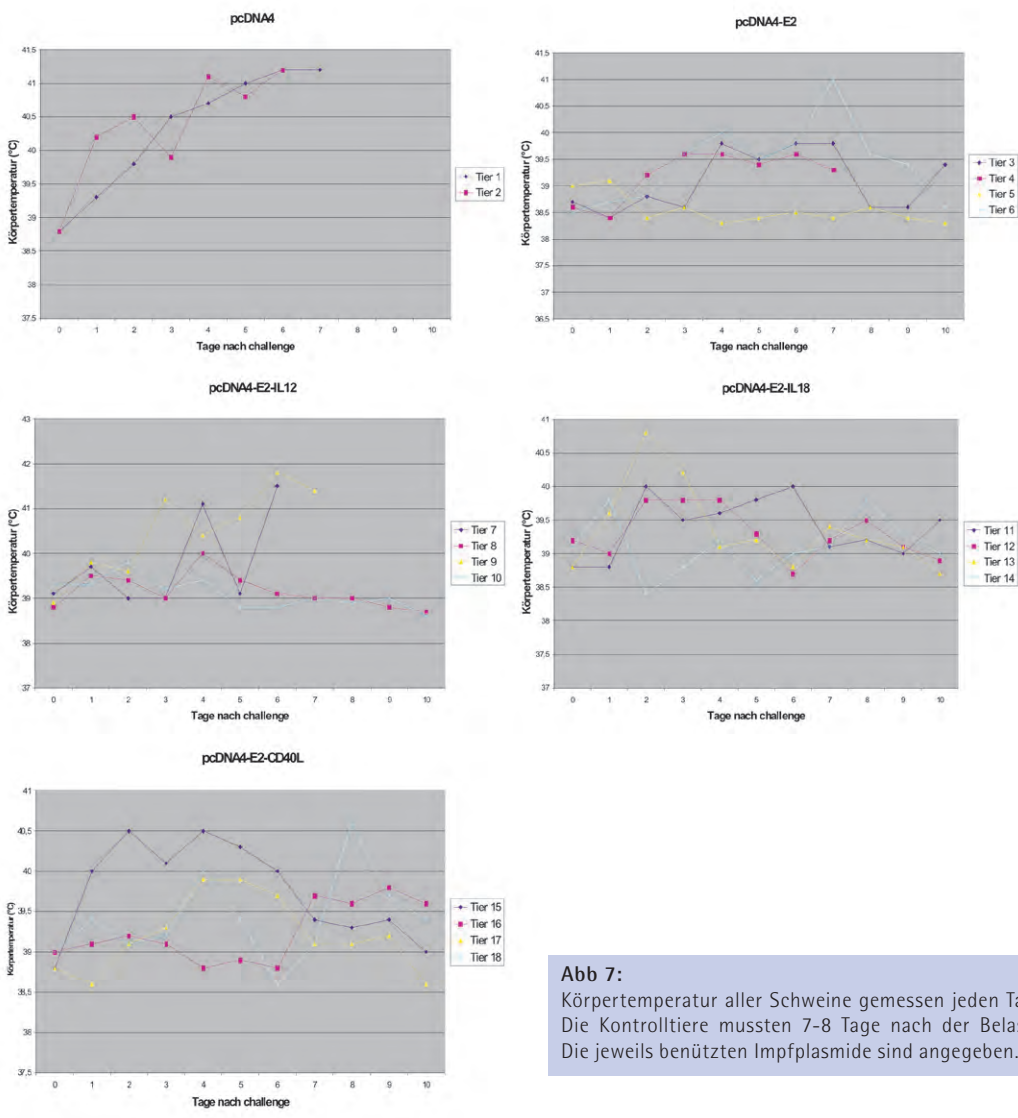


Abb 7: Körpertemperatur aller Schweine gemessen jeden Tag nach der Belastungsinfektion. Die Kontrolltiere mussten 7-8 Tage nach der Belastungsinfektion getötet werden. Die jeweils benutzten Impflasmide sind angegeben.

Beide Tiere, die mit pcDNA4 immunisiert wurden, entwickelten innerhalb von vier Tagen nach der Infektion eine sehr hohe Körpertemperatur und ernste klinische Symptome. Drei der vier Schweine, die mit pcDNA4-E2 immunisiert wurden, zeigten keine Erhöhung der Körpertemperatur über 40°C, das vierte Tier zeigte nur für einen Tag eine Temperatur von 41°C. Interessanterweise zeigte keines der Tiere irgendwelche klinischen Anzeichen einer Infektion. In der dritten Gruppe, immunisiert mit pcDNA4-E2-IL12, zeigten zwei von vier einen deutlichen Temperaturanstieg über 40°C. Diese beiden Tiere zeigten auch deutliche Symptome einer klinischen Erkrankung. Die beiden anderen Tiere zeigten keine Temperaturen über 40°C und auch keine klinischen Symptome. Tiere der anderen beiden Gruppen, die mit pcDNA4-E2-IL18 und pcDNA4-E2-CD40L immunisiert wurden, zeigten keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung, obwohl einzelne Tiere kurzzeitig Körpertemperaturen von über 40°C aufwiesen.

Neben der Abwesenheit klinischer Symptome ist die Vermeidung einer Virusvermehrung im immunisierten Tier ein weiteres Kriterium für eine effektive Vakzine. Deshalb wurden bei allen Tieren Virusisolationsversuche durchgeführt. Hierzu wurde der Virustiter im Blut, in verschiedenen Organen sowie in Nasentupferproben ermittelt. Wie zu erwarten war (Tab. 5), entwickelten beide Tiere der Kontrollgruppe eine Virämie im Blut, in den Organen und in der Nasenschleimhaut. In der zweiten Gruppe, die mit pcDNA4-E2 immunisiert wurde, konnte lebendes Virus nachgewiesen werden. Ein anderes Ergebnis ergab die Gruppe 3, die mit pcDNA4-E2-IL12 immunisiert wurde. Diese Gruppe zeigte ein sehr heterogenes Bild. So konnte von Tier 7 aus dem Blut Virus isoliert werden, nicht jedoch aus den Organen oder aus der Nasenschleimhaut. Dagegen konnte von Tier 8 nur aus Organen Virus isoliert werden. Bei den beiden anderen Tieren dieser Gruppe wurde kein Virus gefunden. In Gruppe 4, immunisiert mit pcDNA4-E2-IL18 und in Gruppe 5, immunisiert mit pcDNA4-E2-CD40L, konnten keine Viren reisoliert werden.

Impfplasmide	Tier-Nr.	Überlebende	Virämie (TCID50/ml)		
			Blut	Organe	Nasentupfer
pcDNA4HisMax	1	0/2	5×10^3	$>2.5 \times 10^6$	1×10^3
	2		5×10^4	$>2.5 \times 10^5$	1×10^4
pcDNA4-E2	3	3/4	–	–	–
	4		–	–	–
	5		–	–	–
	6		–	–	–
pcDNA4-E2-IL12	7	2/4	1×10^1	–	–
	8		–	–	–
	9		–	$>5 \times 10^5$	–
	10		–	–	–
pcDNA4-E2-IL18	11	4/4	–	–	–
	12		–	–	–
	13		–	–	–
	14		–	–	–
pcDNA4-E2-CD40L	15	4/4	–	–	–
	16		–	–	–
	17		–	–	–
	18		–	–	–

Tabelle 5: Virusnachweis von CSFV in Blut, verschiedenen Organen und Nasentupfern nach CSFV Infektion der DNA-geimpften Tiere. Ebenso ist die Überlebensrate (Zahl der Überlebenden/ Gesamtzahl der eingesetzten Tiere pro Gruppe) nach der Belastungsinfektion.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass MKSV ein gutes Modell zur Entwicklung einer auf synthetischen Peptiden basierenden Vakzine darstellt. Zum einen ist die hauptantigene Determinante auf einem einzigen Hüllprotein lokalisiert, zum anderen konnte gezeigt werden, dass der größte Teil der bei einer Virusinfektion erzeugten Antikörper durch Peptid A kompensiert werden können. Versuche mit Rindern und den hier gezeigten Peptiden demonstrieren ebenfalls die Eignung solcher synthetischen Peptide als Antigene in einer anzuwendenden Vakzine.

Eine weitere Entwicklung einer neuen Vakzinestrategie ist die Anwendung von DNAs als Vakzine. Hier wird die zur Etablierung einer Immunabwehr notwendige Exposition des Organismus durch eine Expression relevanter Immunogene im Organismus selbst bewerkstelligt. So konnte im Fall des CSFV gezeigt werden, dass durch Immunisierung mit Expressionsplasmiden, die die für die Immunantwort relevanten Gene im Organismus exprimieren können, ein Impfschutz hervorgerufen wird. Der Einsatz zusätzlicher regulatorischer Gene erlaubt hier eine Modifizierung oder Verstärkung der Immunantwort, wobei hier festgestellt werden muss, dass eine genaue Kenntnis der für den jeweiligen Schutz notwendigen Immunfaktoren essentiell ist.

Literatur kann beim Verfasser angefordert werden.

INSTITUT FÜR EPIDEMIOLOGIE (IfE)

ANSTECKENDE BLUTARMUT DER EINHUFER – DIE SPITZE EINES EISBERGS?

Carolina Probst¹, Patricia König², Jörn Gethmann¹, Detlef Höreth-Böntgen¹, Christoph Staubach¹, Matthias Kramer¹, Franz-Josef Conraths¹

¹Institut für Epidemiologie, ²Institut für Virusdiagnostik

Zwischen 1966 und 2005 wurden in Deutschland nur wenige, vereinzelte Ausbrüche der Ansteckenden Blutarmut der Einhufer gemeldet. Seit 2006 tritt die Krankheit hingegen häufiger auf. Allein im Jahre 2010 wurden 27 Fälle bzw. Ausbrüche gemeldet. In vielen Fällen scheinen aus dem Ausland stammende Pferde betroffen oder die Infektionsquelle gewesen zu sein. Eine besonders wichtige Rolle spielten dabei Pferde aus Rumänien, darunter auch solche, bei denen die für eine Verbringung nach Deutschland erforderlichen Gesundheitszeugnisse und andere Dokumente (z. B. Identitätsnachweise) nicht vorlagen oder möglicherweise gefälscht waren.

EPIDEMIOLOGIE

Die Ansteckende Blutarmut der Einhufer (ABE, Synonyme: Equine Infektiöse Anämie - EIA, Infektiöse Anämie der Pferde) ist eine systemische Viruserkrankung der Equiden, die durch ein Lentivirus aus der Familie der Retroviren verursacht wird (König und Kramer, 2010). Bislang gibt es weder eine Therapie noch einen wirksamen Impfstoff, Heilversuche sind verboten. Die Übertragung des ABE-Virus erfolgt hauptsächlich durch große blutsaugende Insekten wie Bremsen und Wadenstecher. Eine direkte Übertragung von Pferd zu Pferd ist ebenfalls möglich (transplazental, kolostral, laktogen, venerisch sowie über Exkretionen wie Speichel und Urin), setzt jedoch einen engen Tierkontakt voraus. Bei Vernachlässigung von Desinfektions- und Hygienemaßnahmen kann das Virus auch iatrogen übertragen werden, beispielsweise über Injektionskanülen und andere mit Blut oder Sekreten kontaminierte Instrumente wie Maulgatter oder Pflegeutensilien, sowie über nicht lizenzierte Blut- und Plasmaprodukte (Kaiser et al., 2009). Das ABE-Virus zeigt eine für behüllte Viren typische niedrige Tenazität und wird von handelsüblichen Desinfektionsmitteln zuverlässig inaktiviert.

In Deutschland wird die ABE durch die Verordnung zum Schutz gegen die Ansteckende Blutarmut der Einhufer vom 2. Juli 1975, die letztmalig am 4. Oktober 2010 geändert wurde, reglementiert. Jedes Tier, bei dem ABE festgestellt wird, muss getötet und der betroffene Bestand gesperrt und untersucht werden.

KLINISCHE SYMPTOME

Die klinische Erkrankung kann sich akut oder chronisch manifestieren (Iben, 2006). Klinische Episoden dauern in etwa 2 bis 5 Tage und treten in wiederkehrenden Schüben auf, wobei Frequenz und Schweregrad im Infektionsverlauf abnehmen. Die akute Verlaufsform äußert sich in Fieber, Apathie, Schwäche, Ataxie, Ikterus, Tachykardie, Herzarrhythmie sowie Petechien vor allem auf der Zungenunterseite sowie auf Schleimhäuten und Lidbindehäuten. Trächtige Stuten können abortieren oder lebensschwache Fohlen auf die Welt bringen. Die chronische Verlaufsform ist durch Erkrankungsschübe mit rekurrenden Fieberanfällen, Abgeschlagenheit und ventraler Ödembildung gekennzeichnet. Die Namen gebende Anämie, die durch eine immunpathologische Lyse der Erythrozyten entsteht, wird oft nicht beobachtet. In 30 bis 90 Prozent der Fälle treten keine Symptome auf und die Tiere bleiben asymptomatische Carrier, die unerkannt als Infektionsquelle dienen können. Das Fehlen klinischer Leitsymptome erschwert die Diagnosestellung erheblich. Bei therapieresistenten Fieberschüben und Thrombozytopenie sollte stets die ABE differenzialdiagnostisch abgeklärt werden.

DIAGNOSTIK

Infizierte Pferde produzieren etwa ab dem 12. Tag nach Infektion spezifische Antikörper; diese sind 2 bis 3 Wochen nach Infektion, in Ausnahmefällen erst nach mehr als 90 Tagen, mit dem Agargel-Immunodiffusionstest (AGID, Coggins-Test) nachweisbar. Die Sensitivität des Coggins-Tests liegt bei ca. 90-98 Prozent, je nachdem, wie lange der Infektionszeitpunkt zurückliegt. Der Antikörper-ELISA besitzt zwar eine Sensitivität von bis zu 100 Prozent, kann in Einzelfällen jedoch auch falsch-positive Befunde liefern. Daher müssen positive ELISA-Testergebnisse mit dem AGID abgeklärt werden. Antikörper gegen das ABE-Virus können auch mit dem hochsensitiven Western-Blot nachgewiesen werden. Da das Virus im infizierten Tier lebenslang persistiert, ist für die Diagnosestellung der EIAV-Infektion ein positiver serologischer Befund ausreichend. Der Nachweis von Virusgenom am lebenden Tier mittels PCR wird dadurch

erschwert, dass zum einen die Zielzellen Gewebemakrophagen sind und zum anderen die Viruslast im Blut, besonders bei klinisch unauffälligen Tieren, unter die Nachweisgrenze absinken kann. Die PCR gehört daher nicht zu den Routinemethoden der ABE-Diagnostik.

ABE SITUATION IN EUROPA

Innerhalb der Europäischen Union kommt die ABE mit klinischen Fällen in Italien und Rumänien in bestimmten Regionen gehäuft vor (Abb. 1). Weitere Länder, die seit 2009 ABE-Ausbrüche gemeldet haben, sind Belgien, Frankreich, Griechenland, Slowenien und das Vereinigte Königreich. Als Europäisches Drittland meldete auch Kroatien Ausbrüche. Nach den Angaben der EU-Mitgliedsstaaten im Ständigen Ausschuss für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit sowie den epidemiologischen Ausbruchsuntersuchungen in Deutschland zufolge konnten die im Jahre 2010 in Belgien, Deutschland, Frankreich und dem Vereinigten Königreich gemeldeten Ausbrüche zum überwiegenden Teil auf aus Rumänien verbrachte Pferde zurückgeführt werden.

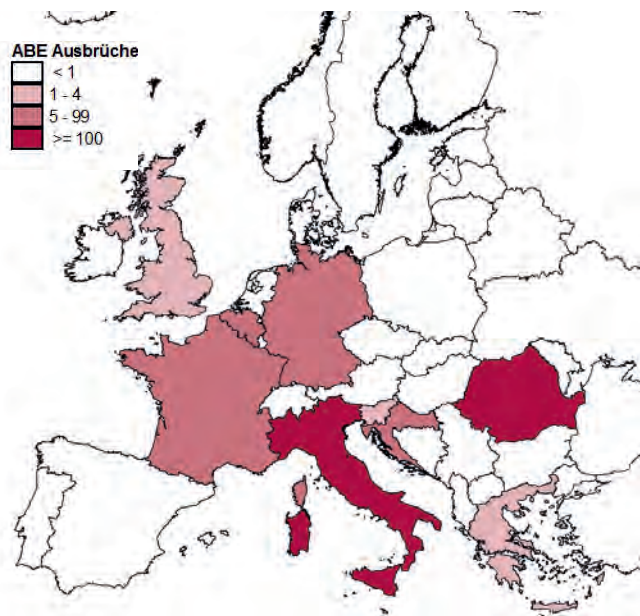


Abb 1: Anzahl der zwischen 1. Januar 2009 und 10. August 2010 an das ADNS gemeldeten ABE-Ausbrüche (Stand: 22. Dezember 2010). Quelle: *Animal Disease Notification System*

In Deutschland treten sporadisch ABE-Fälle auf, wobei die Anzahl jährlich gemeldeter Ausbrüche zwischen 1966 und 2007 stets im einstelligen Bereich lag. Seit Einführung des Tierseuchennachrichtensystems (TSN) im Jahr 1995 wurden bis 2005 nur fünf Ausbrüche gemeldet. Seitdem ist ein leichter Anstieg zu verzeichnen (Abb. 2), vor allem in den Bundesländern Bayern und Hessen (Abb. 3). Betroffen waren Bestände unterschiedlicher Größe mit einem Besatz von

zwei bis über hundert Tieren. In den meisten Betrieben war ein einzelnes Tier infiziert, eine Infektionsübertragung auf Kontakttiere wurde trotz monate- bis jahrelanger Standzeiten nicht beobachtet.

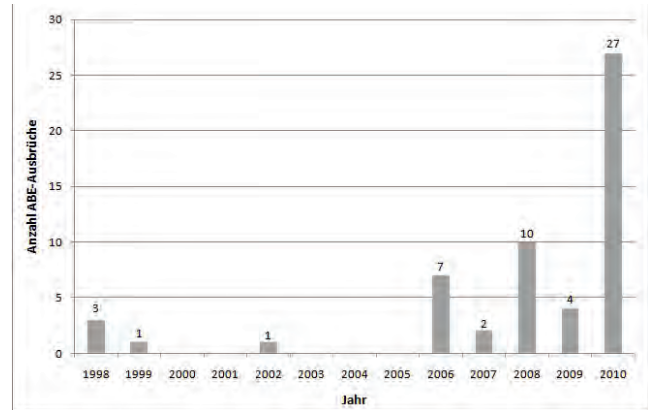


Abb 2: Anzahl festgestellter ABE-Ausbrüche in Deutschland seit 1998 (Stand 04. Januar 2011). Quelle: TSN

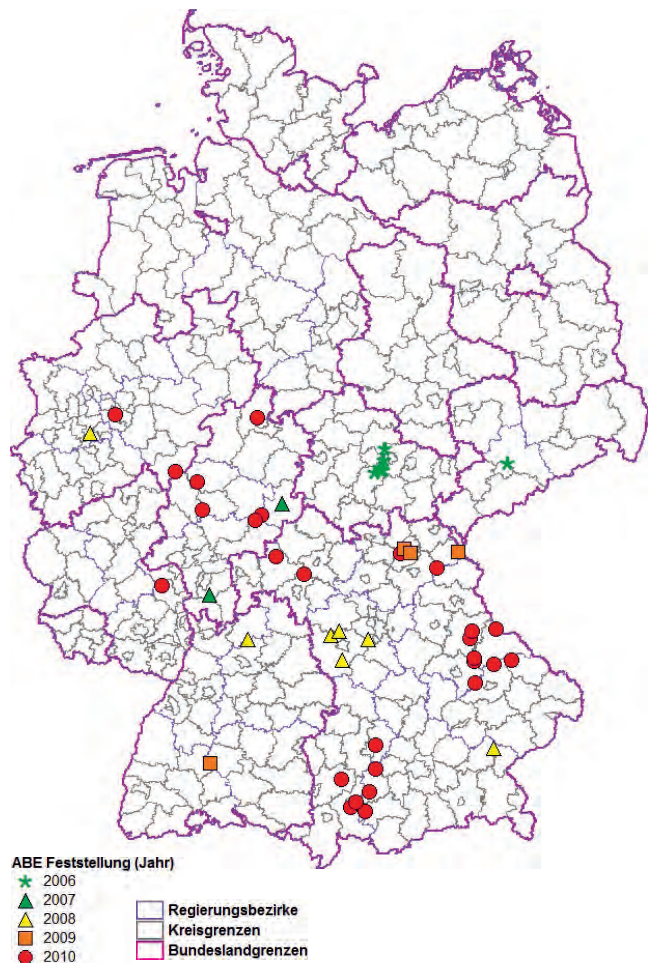


Abb 3: Lokalisation der 50 seit 2006 festgestellten ABE-Ausbrüche in Deutschland (Stand 04. Januar 2011). Quelle: TSN

Im Folgenden wird anhand von ausgewählten Beispielen die Situation in Deutschland näher erläutert.

Im **September 2006** wurde in Thüringen bei einem nach schwerer Erkrankung verendeten Pferd ABE diagnostiziert. Bei der Bestandsuntersuchung wurden acht weitere Kontakttiere und bei der vorgeschriebenen Folgeuntersuchung nach vier Wochen zwei weitere Tiere positiv befundet. Die epidemiologischen Ermittlungen deuteten auf ein aus Rumänien eingeführtes Pferd als Infektionsquelle hin. Die weitere Übertragung erfolgte vermutlich über belebte Vektoren (z. B. blutsaugende Insekten). Insgesamt 21 Pferde aus sieben Beständen mussten getötet werden; fünf von ihnen waren klinisch auffällig (König et al., 2007).

Im **Mai 2007** wurde in Hessen ein Fall von ABE bei einem Criollo festgestellt, welcher im Jahr 2002 zusammen mit weiteren 752 Pferden per Schiffstransport aus Argentinien importiert und nach längerem Aufenthalt in Italien nach Deutschland verbracht worden war. Vor dem Import war das Pferd negativ auf ABE getestet worden (FLI, 2008).

Im **August 2007** wurde in Hessen bei einem Pferd ABE bestätigt, das bereits 1998 im Alter von vier Jahren aus Rumänien nach Deutschland eingeführt und seitdem im selben Bestand gehalten worden war. Wahrscheinlich handelte sich um eine subklinische Infektion eines aus Rumänien stammenden Pferdes (FLI, 2008).

Bei einem im Juli 2008 in Bayern festgestellten Fall handelte es sich um ein Pferd, das etwa acht Jahre zuvor gekauft worden war und vermutlich ursprünglich aus Rumänien stammte (Quelle: TSN).

Im **Jahr 2010** wurde in Deutschland die bislang höchste Anzahl von ABE-Ausbrüchen nachgewiesen (27 Ausbrüche; Stand 04. Januar 2011). Ein Teil der Ausbrüche wurde im Rahmen der epidemiologischen Untersuchungen entdeckt, die nach einem in Hessen bekannt gewordenen Fall durchgeführt wurden. Ein Pferd, das drei Monate zuvor von Rumänien an eine Pferdehändlerin in Deutschland verkauft worden war, war bei einer Ankaufsuntersuchung für ABE-positiv befundet worden. Im Laufe der Ermittlungen stellte sich heraus, dass die Händlerin seit 2008 über 110 Pferde aus Rumänien bezogen und weiterverkauft hatte. Bezüglich der Kennzeichnung und Dokumentation wurden erhebliche Mängel festgestellt (Transpondernummern stimmten nicht immer mit den Equidenpässen überein; die Identität der Tiere wurde in den Pässen nachträglich geändert; manche Tiere hatten keinen oder zwei Transponder). Im Rahmen der Nachverfolgung wurden mehrere hundert Kontaktpferde in Hessen und anderen Bundesländern untersucht. Im Zuge von erweiterten Verfolgungsuntersuchungen kam es auch zur Aufdeckung von Fällen, die nicht mit dem hessischen Geschehen in Verbindung standen. In Bayern wurden weitere Privatpersonen und Viehhändler identifiziert, die unter Verstoß gegen Rechtsvorschriften Pferde aus Rumänien nach Deutschland verbracht hatten.

Wie aus den Befragungen im Rahmen des ABE-Geschehens in Hessen hervorgeht, gibt es einen intensiven Handel mit

Pferden, die aus Rumänien stammen und an Käufer in Deutschland geliefert werden. Dabei handelt es sich insbesondere um Schlacht- und Hobbyperde aus dem Niedrigpreissektor. Aus den Ermittlungen geht zudem hervor, dass die meisten Pferde vermutlich über Kleintransporte mit privaten PKW über die Grenze gefahren werden. Neben den epidemiologischen Untersuchungsergebnissen aus Deutschland gibt es auch Hinweise aus anderen Mitgliedsstaaten wie Belgien, Frankreich und dem Vereinigten Königreich, dass die ABE dorthin über infizierte Pferde aus Rumänien eingeschleppt wurde (Ständiger Ausschuss für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit, 2010).

Seit dem EU-Beitritt Rumäniens am 1. Januar 2007 wurden dort über 1000 ABE-Ausbrüche gemeldet. Dabei waren stets Hobbyhaltungen betroffen. Allerdings zeigten die Ergebnisse eines im Mai 2009 durchgeführten Inspektionsbesuchs des Lebensmittel- und Veterinärarnamtes der Europäischen Kommission in Rumänien, dass die gemeldeten ABE-Fälle nur einen Bruchteil der tatsächlich vorkommenden Anzahl repräsentieren. Zudem ging aus dem Inspektionsbesuch und dem Länderprofil von Rumänien hervor, dass dort die Identifizierung und Registrierung von Equiden unzureichend ist und auch die Entscheidung 2007/269/EG über Maßnahmen zum Schutz vor der infektiösen Anämie der Pferde in Rumänien nur unzureichend umgesetzt, durchgesetzt und überwacht wird. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde mit dem Kommissionsbeschluss 2010/346/EU das innergemeinschaftliche Verbringen von Equiden aus Rumänien europaweit grundsätzlich verboten; Ausnahmen sind an strenge Bedingungen geknüpft.

FAZIT

Eine der Hauptursachen für die im Jahr 2010 in Deutschland aufgedeckten Ausbrüche von ABE sind mit hoher Wahrscheinlichkeit aus Rumänien verbrachte Pferde aus dem Niedrigpreissektor. Aufgrund der Tatsache, dass viele Pferde subklinisch infiziert sind, wird die Krankheit selten, sehr spät oder gar nicht entdeckt. Infizierte Tiere sind lebenslang Virusträger und können auf diese Weise über einen langen Zeitraum unerkannt zur Virusverbreitung innerhalb der Pferdepopulation beitragen. Die epidemiologischen Ermittlungen gestalten sich sehr aufwändig, da noch keine systematischen Ermittlungen mit Hilfe der Equidendatenbank im Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere (HIT) möglich sind und der Import unter Umständen mehrere Jahre zurückliegen kann, sodass die erforderlichen Informationen zur Rückverfolgung von Pferdebewegungen über persönliche Befragungen erhoben werden müssen. Zudem kommt es aufgrund der hohen Mobilität der Reiterei in der Regel zu einer Vielzahl von Tierkontakten, die in die epidemiologischen Untersuchungen einbezogen werden müssen. Da in Deutschland keine routinemäßige Unter-

suchung auf ABE stattfindet, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass die bislang ermittelten Fälle nur die „Spitze des Eisbergs“ darstellen. Zur Klärung der Situation haben verschiedene Bundesländer ein Monitoring-Programm mit Beteiligung des FLI initiiert.

LITERATUR

- FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, BUNDESFORSCHUNGSINSTITUT FÜR TIERGESUNDHEIT. 2008. Jahresbericht 2007. Virus der infektiösen Anämie der Einhufer (EIAV), 2007: 82-83.
- IBEN B. 2006. Ansteckende Blutarmut der Einhufer. Großtierpraxis 7:12.
- KAISER A., H.P. MEIER, R. STRAUB, AND V. GERBER. 2009. Equine Infektiöse Anämie (EIA) Schweizer Archiv für Tierheilkunde 151(4):159-164.
- KÖNIG P. AND M. KRAMER. 2010. Infektiöse Anämie der Einhufer. In: Tiergesundheitsjahresbericht 2009, Friedrich-Loeffler-Institut, pp. 31-34.
- KÖNIG P., M. KRAMER, AND J. TEUFFERT. 2007. Infektiöse Anämie der Einhufer. In: Tiergesundheitsjahresbericht 2006, Friedrich-Loeffler-Institut, pp. 79-83.

ARBEITSGRUPPE INTERNATIONALE TIERGESUNDHEIT (AG-ITG)

DER MENSCH ALS HAUPTFAKTOR IN DER LOKALEN UND GLOBALEN VERBREITUNG DER AFRIKANISCHEN SCHWEINEPEST

Wolfgang Böhle, Klaus Depner

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) ist wegen ihrer hohen Letalität, ihrer schweren sozioökonomischen Konsequenzen, der unvorhersehbaren internationalen Verbreitung sowie fehlender Möglichkeiten zur therapeutischen oder impfprophylaktischen Bekämpfung eine der wichtigsten Schweineseuchen. Seit 2007 breitet sich die Tierseuche im Kaukasus aus, in Afrika stellt sie ein permanentes Problem dar. Die Arbeitsgruppe internationale Tiergesundheit (AG-ITG) des FLI erarbeitete im Rahmen internationaler Missionen im Jahr 2010 Empfehlungen zur Bekämpfung der ASP in Osteuropa und Westafrika.

In Afrika sind seit jeher Lederzecken (*Ornithodoros mubata*-Gruppe) in allen Stadien zusammen mit Warzenschweinen (*Phacochoerus aethiopicus*) im sogenannten sylvatischen Zyklus das natürliche Virusreservoir der ASP. In einem urbanen Zyklus können auch Hausschweine mit und ohne Zeckenbeteiligung als Erregerreservoir fungieren. Während es in Hausschweinen zu schweren fieberhaften hämorrhagischen Erkrankungen mit unterschiedlichen Verlaufsformen kommen kann, verläuft die Infektion beim Warzenschwein, dem natürlichen Wirt, asymptomatisch. Da Zecken in der Verbreitung des Virus eine aktive Rolle spielen können, sind die Kriterien einer Arbovirusinfektion gegeben.

GLOBALES VORKOMMEN DER ASP

Erstmalig wurde die ASP 1921 in Kenia beschrieben, danach auch in anderen östlichen und südlichen Ländern Afrikas. 1957 wurde das Virus mit aller Wahrscheinlichkeit aus Angola nach Portugal verschleppt. In den Folgejahren breitete sich die Seuche über die ganze iberische Halbinsel aus und erreichte auch Frankreich, Italien, Malta, Belgien und die Niederlande. Von lang andauernden Endemien waren allerdings nur Spanien und Portugal betroffen, wo es bis zu 30 Jahre gedauert hat, um die Seuche gänzlich zu tilgen, sowie Sardinien, wo sie auch heute noch endemisch ist. In der ehemaligen Sowjetunion gab es 1977 einen sporadischen ASP-Ausbruch auf der Krimhalbinsel.

Ende der 1970er Jahre wurden Seuchenausbrüche aus Kuba (1977), Brasilien und der Dominikanischen Republik (1978)

sowie aus Haiti (1979) gemeldet. Die Tilgung in diesen Ländern gelang nur nach großangelegten Keulungsaktionen. Ob das Virus ursprünglich aus Europa oder aus Afrika eingeschleppt wurde, blieb ungeklärt.

In Westafrika wurde ASP zum ersten Mal 1978 aus Senegal und 1982 aus Kamerun gemeldet. Auch hier herrscht noch Unklarheit, ob das Virus aus Zentralafrika oder aus Europa eingeschleppt wurde. Ab der zweiten Hälfte der 1990er Jahre wurde ein hohes Seuchenaufkommen in vielen westafrikanischen Ländern verzeichnet, was wiederum ein hohes Infektionsrisiko für andere Regionen Afrikas darstellt.

Im Juni 2007 wurde die Seuche aus fast allen Landesteilen Georgiens gemeldet. Einige Monate später kamen die ersten Seuchenmeldungen aus Armenien und aus Tschetschenien, im grenznahen Gebiet zu Georgien. Anfang 2008 war ein Dorf in Aserbaidzhan betroffen und in den Folgemonaten breitete sich die Seuche insbesondere in Russland aus. Hunderte von Fällen wurden seit Beginn des Seuchenzuges im Kaukasus sowohl bei Hausschweinen als auch bei Wildschweinen registriert. Mittlerweile ist ASP im Westen Russlands bis unmittelbar an die Ukrainische Grenze und im Norden bis in die Region um St. Petersburg vorgerückt. Auch in südliche Richtung, in den Nordiran hinein, hat sich die ASP ausgebreitet, wo sie bei Wildschweinen diagnostiziert wurde.

FAKTOREN, DIE EINE VIRUSVERSCHLEPPUNG BEGÜNSTIGEN

Obwohl behüllt, ist das ASP Virus verhältnismäßig stabil. Lange Überlebenszeiten werden durch feuchte proteinhaltige Medien sowie kühle Temperaturen begünstigt. In einem proteinhaltigen Substrat (z. B. Serum) kann das Virus bei Raumtemperatur bis zu 18 Monate überleben und bei 37°C bis zu einem Monat. Allerdings wird der Erreger bei 60°C innerhalb von 30 Minuten inaktiviert. Auch die geringe pH-Empfindlichkeit ist erstaunlich, ist das Virus doch in pH-Bereichen von 4 bis 10 relativ stabil. Zersetzungsprozesse wirken daher nicht unmittelbar inaktivierend, so dass das Virus im Serum bis zu 15 Wochen und im Kot bis zu 11 Tage

überleben kann. Im Knochenmark wurden Überlebenszeiten von mehreren Monaten festgestellt.

In rohem Schinken sowie in Wurstwaren, die nicht ausreichend hitzebehandelt wurden, bleibt das ASP Virus monatelang infektiös (drei bis sechs Monate). Somit sind nicht ausreichend hitzebehandelte Fleisch- und Wurstwaren, getrocknete oder gesalzene Fleischprodukte, Blut und Fleischmehl eine gefährliche Infektionsquelle, wenn sie an Schweine verfüttert werden.

Diese relativ langen Überlebenszeiten des ASP-Virus in Fleisch und Fleischprodukten zusammen mit der Abfallverfütterung solcher Produkte an Schweine stellt einen der gängigsten Verschleppungswege der Seuche über Tausende von Kilometern dar. Insbesondere die Speiseresteverfütterung mit Abfällen, die von Schiffen und Flugzeugen stammen, wird für Neueinschleppungen in seuchenfreien Regionen verantwortlich gemacht. Mit allergrößter Wahrscheinlichkeit ist 2007 das ASP Virus auf diesem Wege in den Südkaukasus eingebracht worden.

Das Zeckenreservoir

Lebensweise und Verhalten von Lederzecken der Klasse Ornithodoros sind recht ungewöhnlich. Sie leben in den Bauten der Warzenschweine und befallen schon die Jungtiere gleich nach deren Geburt. Mit der Blutmahlzeit übertragen sie auch gleich die ASP-Viren. Es scheint ein Gleichgewicht zu existieren zwischen Zecken, Viren und Warzenschweinen, die keine klinischen Symptome zeigen. Die Krankheit bricht nur aus, wenn Hausschweine betroffen sind. Ornithodoros-Zecken sind blind, nachtaktiv und ziemlich schwer ausfindig zu machen. Tagsüber verbergen sie sich in kleinen Spalten und Rissen von Wänden oder im Boden, sie bleiben auch gern in den Strohdächern von Grashütten, wo es äußerst schwierig wird, sie zu bekämpfen, außer, man verbrennt die Hütte und baut sie neu auf. Sie sind nur drei bis fünf Millimeter groß und werden auch vollgesaugt nicht viel größer. Nur sehr selten werden sie an einem Wirt gefunden, weil sie sich sehr schnell fallen lassen, sobald sie gestört werden. Sie fressen gewöhnlich während der Nacht, wenn die Tiere schlafen, aber auch dann brauchen sie weniger als eine Stunde für eine volle Blutmahlzeit. Sie haben eine hohe Resistenz gegen Austrocknung und Verhungern, demzufolge können sie Jahre ohne eine Blutmahlzeit ausharren, aber doch ansteckend bleiben. Sobald sie eine CO₂-Quelle entdecken, werden sie davon angezogen, ganz gleich ob es sich um ein warmblütiges Säugetier oder eine CO₂-Falle mit Trockeneis handelt.

DIE SEUCHENVERBREITUNG

Fallbeispiel 1:

Anfang 2007 wurde in der unmittelbaren Umgebung der Hafenstadt Poti in Georgien am Schwarzen Meer eine stark erhöhte Sterblichkeitsrate bei Schweinen registriert. Infolge dieses Geschehens wurden von vielen Bauern in der betroffenen Umgebung die Schweine vorsorglich geschlachtet. Ein Überangebot an Schweinefleisch, das unter den marktüblichen Preisen gehandelt wurde, hat demzufolge Käufer aus allen Regionen des Landes angezogen. Einige Monate später, als im Juni ASP offiziell festgestellt wurde, waren fast alle Landesteile von der Seuche betroffen. Auffallend war, dass insbesondere Ortschaften, die an den Hauptverkehrsstraßen lagen, betroffen waren (Abb. 1).

Obwohl sich die Virusverbreitung ausgehend von Poti in die restlichen Kaukasusgebiete im Detail schwer nachweisen lässt, kann angenommen werden, dass das Virus mit Speiseabfällen von Schiffen auf die nicht eingezäunte Müllhalde der Hafenstadt gelangt ist. Frei herumlaufende Schweine, die sich auf Futtersuche befanden und ungehinderten Zu-



Abb 1: Ausbrüche Afrikanischer Schweinepest im Kaukasus, der Ersteintrag erfolgte vermutlich mit Speiseabfällen von Schiffen in der Hafenstadt Poti in Georgien.

gang zu den Müllhalden hatten, waren vermutlich die ersten Infektionsoffer, die dann zu einer lokalen Weiterverschleppung des Erregers beigetragen haben. Die überregionale Verschleppung erfolgte über billiges Schweinefleisch von infizierten Tieren, die notgeschlachtet wurden. Diese infizierten Produkte trugen zu einer spinnennetzartigen Virusausbreitung entlang der großen Handelsstraßen bei.

Es sei noch zu vermerken, dass der Genotyp des kaukasischen ASP-Virusisolates die größten Ähnlichkeiten mit ASP-Viren in Südafrika hat und somit auf eine Einschleppung aus dieser Erdregion hindeutet.

Fallbeispiel 2:

In einem abgelegenen kaukasischen Gebirgsdorf, das nur nach längerer Autofahrt mit einem Geländefahrzeug über eine schlecht befahrbare Schotterstraße zu erreichen war, erkrankten und starben fast alle Schweine, rund 400, innerhalb von drei Monaten an ASP. Der nächstgelegene Ort, in dem die ASP festgestellt wurde, war ein größeres Dorf im Tal, direkt an der Hauptverkehrsstraße gelegen, an der sich wiederum mehrere infizierte Ortschaften befanden. Es stellte sich nun die Frage, wie das Virus in das abgelegene Gebirgsdorf gelangen und sich dann innerhalb des Dorfes ausbreiten konnte.

Die epidemiologischen Ermittlungen haben ergeben, dass es in den Schulzeiten eine regelmäßige Busverbindung zwischen dem Gebirgsdorf und dem infizierten Dorf im Tal gab. Morgens brachte der Bus die Schulkinder in das Dorf an der Hauptstraße und abends fuhr er mit ihnen wieder nach Hause. Der Busfahrer wohnte im Gebirgsdorf und hielt selbst mehrere Schweine im Hinterhof. Seine Schweine waren auch die ersten Tiere, die an der Seuche erkrankten und starben. Der zweite Hof, der anschließend von ASP betroffen war, war der des Dorftierarztes, der zu den kranken Schweinen des Busfahrers gerufen wurde. In den Folge Monaten erkrankten die restlichen Schweine der abgelegenen Ortschaft. Als Anekdote ist zu vermerken, dass ein einzelnes Schwein eines Bauern, das zusammen mit dessen Rindern auf die Weide ging und keinen Kontakt zu anderen Schweine hatte, nicht an ASP erkrankt ist. Auch nach dreimonatigem Seuchengeschehen war dieses Schwein seronegativ geblieben.

Fallbeispiel 3:

In Aserbaidschan, einem Land mit mehrheitlich muslimischer Bevölkerung und einer unwesentlichen Schweinepopulation, wurde die ASP in einem Dorf einige Hundert Kilometer östlich der georgischen Grenze Anfang Januar 2008 diagnostiziert. Dieses Dorf wird mehrheitlich von Christen bewohnt. In den benachbarten Dörfern der betroffenen Gegend wohnen hauptsächlich Moslems, die keine Schweine halten und daher für das Infektionsgeschehen keine Rolle spielen.

Die Ermittlungen hatten ergeben, dass viele Schulkinder aus dem christlichen Dorf von ihren Eltern nach Georgien in christliche Schulen geschickt wurden, wo sie ganzjährig in Schulinternaten wohnten. Mitte Dezember, zu Beginn der Weihnachtsferien, wurden die Kinder von ihren Eltern abgeholt. Das Abholen der Kinder wurde auch gleichzeitig mit Verwandtenbesuchen und Großeinkäufen, vor allem von Schweineerzeugnissen, für die anstehenden Weihnachtsfeiern kombiniert. Traditionsgemäß werden während der Feiertage viele Schweinefleischprodukte konsumiert.

Wenn man den Ferienbeginn, die Weihnachtsfeierlichkeiten und die Inkubationszeit der ASP in Betracht zieht, erscheint eine Viruseinschleppung aus Georgien mit infiziertem Schweinefleisch im Zuge der Rückkehr der Internatskinder als sehr plausibel.

Fallbeispiel 4:

Der jüngste Fall von ASP im Norden Russlands in der Gegend von St. Petersburg ereignete sich in einer Hinterhofhaltung mit mehreren Schweinen. Diese Schweine wurden unter anderem mit Speiseabfällen einer nahegelegenen Offizierschule gefüttert. In dieser Militäreinrichtung werden Offiziersanwärter aus allen Landesteilen Russlands ausgebildet. Es wird davon ausgegangen, dass Lebensmittelpakete, die die Offizierschüler regelmäßig erhalten, infiziertes Schweinefleisch enthalten haben, das wiederum seinen Weg über die Speiseabfallverfütterung in die nahegelegenen Schweinehaltungen gefunden hat.

Fallbeispiel 5:

Der erste ASP-Ausbruch in Benin (Westafrika) wurde 1997 auf dem Markt von Dantokpa entdeckt, einem Teil von Cotonou, der direkt am Ufer der großen Lagune von Cotonou liegt. Da auf diesem Markt auch Güter aus den Nachbarländern gehandelt werden, ist eine Einschleppung über den kleinen Grenzverkehr wahrscheinlich. Von da aus breitete sich die Krankheit schnell im ganzen Land aus. Die Hauptfaktoren für die rasante Ausbreitung sind unprofessionelle Schweinehaltungsbedingungen. Ein Teil der Tiere wird in primitiven Ställen gehalten, die meisten jedoch sind freilaufend und suchen sich Futter und Unterschlupf in eigener Regie (Abb. 2 und 3). Die Folge der großen ASP-Ausbrüche von 1997 und dann später in 2002 war eine 80-prozentige Reduktion der Beniner Schweinepopulation auf nur noch drei Tiere pro Quadratkilometer. Laut einer Schätzung von 2008 wurden nur noch 340.000 Schweine gehalten. Neuen Schätzungen zufolge hat die Zahl der Schweine in den letzten Jahren leicht zugenommen und wird auf über 400.000 angesetzt.

Inzwischen kann die ASP in diesem Teil Afrikas als endemisch angesehen werden und das Risiko weiterer Ausbrüche bleibt hoch. Die Rolle der Warzenschweine (*Phacochoerus africanus*) und Buschschweine (*Potamochoerus larvatus*) als Virusreservoir bleibt unklar. Im nordwestlichen Benin, in



Abb 2:
Auf Futtersuche im Gestrüpp



Abb 3:
Diese Dame hatte ihre Tiere mit Kraftfutter angelockt, normalerweise streifen sie tagsüber in der Gegend herum, nur in der Nacht kommen sie in den kleinen Stall.

der Nähe der Nationalparks entlang der Grenzen zu Togo und Burkina Faso, haben wilde und domestizierte Schweine viele Gelegenheiten, in engen Kontakt zu kommen. Allerdings gibt es keine verlässlichen Zahlen über Wildtierdichten. Im Norden des Landes, besonders in den zwei Nationalparks (Nationalpark Pendjari, Nationalpark „W des Niger“) wird von einer hohen Warzenschweindichte ausgegangen. Zum Süden wird die Warzenschweinpopulation dünner. Buschschweine können in einem Gebiet südlich von Bohicon bis fast zur Küste angetroffen werden.

Erlegte Warzenschweine werden an den Sammelplätzen der Jäger geöffnet, zerlegt und alle nicht verwertbaren Teile werden direkt in den nahe gelegenen Busch geworfen. Etwa einen Monat nach der Jagdzeit treten gehäuft ASP-Ausbrüche bei Hausschweinen auf. Man kann annehmen, dass diese Jagdmethoden die Übertragung von ASP und anderen Krankheiten begünstigen.

SCHLUSSFOLGERUNG

Alle geschilderten Fallbeispiele sollen verdeutlichen, welche zentrale Rolle der Mensch bei der Weiterverbreitung der ASP hat. In der Regel sind fast alle Merkmale, die zur Seuchenverbreitung beitragen, menschlicher Natur. Wenn die Seuche in eine Region gelangt, können andere Faktoren, wie z. B. das Vorkommen von Lederzecken oder wild lebender Schweine, einen endemischen Zustand begünstigen. Für die überregionale Ausbreitung ist aber ausschließlich der Mensch verantwortlich.

Als für die Weiterverbreitung verantwortliche Faktoren sind zu nennen:

- mangelnde Biosicherheit der Schweinehaltungen, meist bedingt durch sozioökonomische Verhältnisse,
- fehlendes gutes Management im Schweinesektor,
- Abfallverfütterung von nicht hitzebehandelten Küchenabfällen,
- Unkenntnis der Krankheit und ihrer Verbreitung sowohl bei den Bauern, den Jägern als auch bei den Veterinären,
- überforderte nationale und lokale Veterinärdienste,
- keine adäquaten Bekämpfungsmaßnahmen und fehlende staatliche Unterstützung.

In vielen Ländern stammt die Gesetzgebung, die sich mit der Bekämpfung von Tierkrankheiten befasst, aus den sechziger Jahren. Es ist daher ratsam, diese unter Berücksichtigung modernster wissenschaftlicher Erkenntnisse zu überarbeiten. Des Weiteren sind Bewusstseins- und Sensibilisierungskampagnen in allen Sektoren der Gesellschaft notwendig. Alle Menschen, die mit der Produktion, der Verarbeitung und dem Verbrauch von Schweinen und Schweineprodukten zu tun haben, können ihr Verhalten so ändern, dass der Verbreitung von ASP ein Riegel vorgeschoben wird. Besonders wichtig ist dabei die Gruppe der Landwirte und Tierärzte.

Literatur kann bei den Verfassern angefordert werden.

IV. LAUFENDE FORSCHUNGSPROJEKTE

1 VIREN

1.1 DNA-VIREN

1.1.1 Familie *Herpesviridae*

Die Ordnung der *Herpesvirales* umfasst umhüllte Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom und einem Viruspartikel aus Core, ikosaedrischem Kapsid, Tegument und Hülle. Die bei Säugern, Vögeln und Reptilien vorkommenden Herpesviren werden auf Grund phylogenetischer Gemeinsamkeiten in der Familie *Herpesviridae* zusammengefasst, während die Herpesviren der Fische und Amphibien die Familie *Alloherpesviridae* bilden und das bisher einzige bekannte Herpesvirus der Weichtiere, das Austern-Herpesvirus, in die Familie *Malacoherpesviridae* eingruppiert wird. Die Vertreter der *Herpesviridae* werden auf Grund biologischer Unterschiede in die drei Unterfamilien der *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae* unterteilt. Wichtige tierpathogene Herpesviren finden sich insbesondere bei den *Alphaherpesvirinae*, so z. B. der Erreger der Aujeszkyschen Krankheit der Schweine (Suid Herpesvirus 1, Pseudorabies Virus), das bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1), die equinen Herpesviren 1 und 4 (EHV-1, -4), der Erreger der Marek'schen Krankheit beim Geflügel (Gallid Herpesvirus 2, Marek's Disease virus) oder das Virus der infektiösen Laryngotracheitis der Hühner (Gallid Herpesvirus 1, Infectious Laryngotracheitis Virus). Ein gemeinsames Merkmal der Herpesviren ist ihre Fähigkeit, im infizierten Organismus eine lebenslange Latenz auszubilden, aus der die Viren jederzeit reaktiviert werden können, was eine effiziente Kontrolle erschwert.

1.1.1.1 PSEUDORABIESVIRUS

Das Pseudorabiesvirus (PrV) ist als Erreger der Aujeszkyschen Krankheit (AK) ein bedeutendes Pathogen in der Nutztierhaltung. Gleichzeitig dient es als eines der bestuntersuchten animalen Herpesviren als Modell für die Aufklärung grundlegender Prozesse bei der Herpesvirusreplikation. Herpesviren kodieren für mehr als 70 virale Proteine und Herpesvirus-Partikel bestehen aus mehr als 30 viralen sowie einer Reihe von zellulären Proteinen. Es handelt sich also um hochkomplexe virale Erreger. Ziel unserer Arbeiten ist die Aufklärung der molekularen Prozesse bei der Virusinfektion im Zusammenspiel zwischen viralen und zellulären Faktoren. Hierzu werden biochemische (Proteomanalyse), genetische (Virusmutanten) und bildgebende Verfahren (Elektronenmikroskopie, Live-Cell Video Imaging) zur Analyse von Infektionen mit dem Pseudorabies Virus (PrV) und vergleichend mit dem verwandten, humanpathogenen Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) eingesetzt.

Strukturanalysen am Glykoprotein H des Pseudorabies Virus

Die Adsorption an die Zielzelle und die Fusion von Virus-hülle und zellulärer Plasmamembran werden durch virale glykosylierte Hüllproteine (Glykoproteine) vermittelt. Die Bindung an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche vermittelt bei den Alphaherpesviren das Glykoprotein D (gD). Ein Komplex aus den Glykoproteinen H und L (gH/gL) sowie das eigentliche fusionsaktive Glykoprotein B (gB) sind für die nachfolgende Fusion unabdingbar und bei allen Vertretern der *Herpesviridae* konserviert. In Kooperation mit einer französischen Arbeitsgruppe konnten wir erstmals die molekulare Struktur eines PrV-Proteins, des PrV gH, im Komplex mit einem monoklonalen Antikörper aufklären. Hierzu wurde eine Methode zur Produktion rekombinanter Fab in *Drosophila* S2 Zellen für den Einsatz in der Strukturbio-logie entwickelt. Stabil transfizierte S2 Zelllinien, die das gewünschte Fab Molekül exprimieren, sezernieren das rekombinante Protein. Nach Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie konnten 16 mg gereinigtes Protein pro Liter Zellkultur gewonnen werden. Das Fab Fragment war funktionell und bildete einen Komplex mit dem von ihm erkannten Antigen, gH. Die biochemische Charakterisierung zeigte eine weniger umfangreiche Glykosylierung in Fab von *Drosophila* S2-Zellen als in Fab, das von Säuger-Hybridomazellen durch Spaltung gewonnen wurde. Dies könnte für die Kristallisierung von Vorteil sein. Die Produktion von rekombinanten Fab Molekülen in S2 Zellen ist schneller und erheblich kostengünstiger als der enzymatische Verdau monoklonaler Antikörper. Anschließend konnte nach Ko-Kristallisation die molekulare Struktur des gH-Fab-Komplexes mit einer Auflösung von 2.1 Å bestimmt werden. Verglichen mit vielen gut untersuchten umhüllten Viren verwenden Herpesviren zur Fusion von viraler Hülle und zellulärer Plasmamembran eine deutlich komplexere Maschinerie. Die Fusion wird durch gB, ein Klasse III Fusionsprotein, das strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Glykoprotein G des Virus der vesikulären Stomatitis zeigt, zusammen mit einem heterodimeren Komplex aus gH und gL vermittelt. In PrV kann der gH/gL Komplex durch ein chimäres Protein ersetzt werden, in dem die Rezeptorbindungsdomäne des Glykoproteins D (gD) an ein N-terminal verkürztes Kernfragment des gH fusioniert ist. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers konnte die Struktur dieses Kernfragments aufgeklärt werden. Grundsätzlich zeigen sich erhebliche strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den gH Proteinen von HSV-1, PrV und dem humanpathogenen Epstein-Barr Virus. Die gH Proteine bestehen aus vier Domänen, wobei die erste Domäne die Interaktion mit gL vermittelt. In der zweiten Domäne ist eine Syntaxin-ähnliche Struktur lokalisiert, während in der hochkonservierten Domäne IV ein konservierter hydrophober Bereich durch eine möglicherweise bewegliche ‚Abdeckung‘ geschützt vorliegt. Dieser hydrophobe, membran-nahe Bereich könnte nach einer räumlichen Änderung den eigentlichen, durch gB vermittelten Fusionsvorgang initiieren.

BACKOVIC *et al.* 2010. Efficient method for production of high yields of Fab fragments in *Drosophila* S2 cells. *Protein Eng Des Sel* 23:179-174.

BACKOVIC *et al.* (2010). Structure of a core fragment of glycoprotein H from pseudorabies virus in complex with antibody. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107: 22635-22640.

Institut Pasteur, Paris; Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (beide Frankreich); cGlobal Phasing Ltd., Cambridge (UK); Karolinska Institute, Stockholm (Schweden); Friedrich-Loeffler-Institut, IMB (Deutschland)

Zufällige, Transposon-vermittelte Mutagenese des essentiellen großen Tegumentproteins pUL36 des Pseudorabies Virus

Nach der Verschmelzung von Virushülle und zellulärer Plasmamembran wird das virale Kapsid mit einigen assoziierten Tegumentproteinen mit Hilfe zellulärer Motorproteine entlang von Mikrotubuli zur Kernpore transportiert, wo es zur Translokation der viralen genomischen DNA in den Zellkern kommt. Hier finden virale Genexpression und Genomreplikation statt. Neue Kapside, in die die vervielfältigten Genome verpackt werden, bilden sich autokatalytisch im Zellkern. Reife Kapside verlassen den Kern durch Knospung an der inneren Kernmembran und nachfolgende Fusion der primären Virushülle mit der äußeren Kernmembran. Im Zytoplasma findet dann die eigentliche Virusreifung, d. h. Anlagerung von Tegument und sekundäre Umhüllung, statt. Anschließend werden die reifen Virionen im Inneren von Transportvesikeln an die Zelloberfläche transportiert und durch Exozytose entlassen.

Das innerhalb der *Herpesviridae* konservierte, sehr große Tegumentprotein pUL36 ist sowohl für initiale Infektionsschritte nach der Membranfusion, d. h. Transport der Kapside zur und Andocken an der Kernpore, als auch für späte Stadien der Virusmorphogenese im Zytoplasma von essentieller Bedeutung. Erstaunlicherweise sind aber große Bereiche des Proteins offenbar funktionell nicht relevant. Um die für die Funktion des pUL36 wichtigen Bereiche zu lokalisieren, wurde eine Mutagenese des pUL36 durchgeführt. Mittels zufälliger Transposon-vermittelter Mutagenese wurden 26 pUL36-Mutanten isoliert und näher charakterisiert. Während die meisten dieser Mutanten den Defekt einer PrV-UL36-Deletionsmutante komplementieren konnten, erwiesen sich sechs Mutanten mit Insertionen in der zentralen Region des Proteins als nicht funktionell. Dieser zentralen Region kommt offenbar eine wichtige Rolle bei der Funktion des Proteins zu. Sie soll in weiterführenden Untersuchungen näher charakterisiert werden.

Von den funktionellen Insertionsmutanten replizierte der größte Teil vergleichbar zum Wildtypvirus. Allerdings zeigten Mutanten mit Insertionen an Aminosäureposition 597 oder 689 eine Reduktion der Titer und auch der Plaque-durchmesser sowie ultrastrukturell eine Beeinträchtigung der Virusreifung, während eine dritte Mutante an Aminosäureposition 1800 zwar deutlich kleinere Plaques als der

Wildtyp ausbildet, sich aber sonst vergleichbar zum Ausgangsstamm verhält. Mit diesen Untersuchungen konnten bereits beschriebene Regionen hinsichtlich ihrer Funktionalität bestätigt und weitere nicht-essentielle und essentielle Regionen des pUL36 identifiziert werden.

MÖHL *et al.* 2010. Random transposon-mediated mutagenesis of the essential large tegument protein pUL36 of pseudorabies virus. *J Virol* 84:8153-8162.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Analyse von Pseudorabies und Herpes Simplex Virus Rekombinanten, denen gleichzeitig die pUL17 und pUL25 Komponenten des C-Kapsid-spezifischen Komplexes fehlen

Nach dem Zusammenbau der Kapside im Zellkern werden präferentiell DNA-enthaltende reife Nukleokapside durch die Kernmembran ins Zytoplasma transportiert. Nukleokapside, auch als C-Kapside bezeichnet, unterscheiden sich von unreifen Kapsidvorläufern durch die Anlagerung der beiden Proteine pUL17 und pUL25 in einem heterodimeren C-Kapsid spezifischen Komplex. Diesem Komplex wird eine wichtige Rolle bei der Freisetzung der Nukleokapside aus dem Kern zugeschrieben, wobei seine eigentliche Funktion bis heute aber unklar ist. Wir haben diesen Komplex in PrV und HSV-1 vergleichend untersucht.

Homologe der UL17 und UL25 Genprodukte von HSV-1 sind innerhalb der *Herpesviridae* konserviert und essentiell für die Virusvermehrung. Ihre exakte Funktion ist jedoch noch unklar. Obwohl beide Proteine einen Komplex auf DNA-enthaltenden C-Kapsiden bilden, unterscheiden sich die beobachteten Replikationsdefekte bei Abwesenheit eines Komplexpartners. Fehlt pUL17, kommt es nicht zur Spaltung und Verpackung neu replizierter viraler DNA, während in Abwesenheit von pUL25 virale DNA verpackt wird, die Nukleokapside aber den Kern nicht verlassen können. Das HSV-1 pUL25 konnte einen Defekt in einer pUL25-Deletionsmutante von PrV teilweise kompensieren, was auf überlappende Funktionen dieser Proteine hindeutet. Die reziproke Komplementierung fand allerdings nicht statt. Die pUL17 Proteine transkomplementieren in keiner Richtung. Um zu untersuchen, ob der gleichzeitige Austausch beider Komplexpartner das Komplementationsmuster verändert, wurden Virusmutanten isoliert, denen beide Proteine fehlen und diese auf Zellen propagiert, die beide Komplexpartner exprimieren. Während im homologen System eine Komplementierung erfolgte, konnte im heterologen Ansatz keine Komplementierung nachgewiesen werden. Die konservierten Proteinkomplexe von HSV-1 und PrV haben demnach entweder doch unterschiedliche Funktionen oder sie benötigen für ihre Funktion Interaktion mit anderen viralen Proteinen, die im heterologen Kontext beeinträchtigt oder nicht vorhanden sind.

KUHN *et al.* 2010. Analysis of pseudorabies and herpes simplex virus recombinants simultaneously lacking the pUL17 and pUL25 com-

ponents of the C-capsid specific component. *Virus Res* 153:20-28.
Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Untersuchung der Genexpression von PrV-infizierten Rindernierenzellen durch eine Kombination von Transkript- und quantitativer Proteomanalyse

Bei der Infektion durch Herpesviren wird die Wirtszelle massiv beeinflusst. Zelluläre Gene werden ab- oder angeschaltet, um ein für die Virusvermehrung optimiertes zelluläres Umfeld zu schaffen. Wir untersuchten diese subtilen Interaktionen parallel auf Transkriptebeine unter Verwendung einer Affymetrix-Plattform und auf Proteinebene mittels quantitativer Massenspektrometrie an Madin-Darby Rindernierenzellen (MDBK) vier Stunden nach Infektion mit PrV. Als analytische Plattform für die Proteomuntersuchung steht die großformatige, zweidimensionale Elektrophorese (2DE) in Kombination mit MALDI-TOF-TOF Massenspektrometrie zur Verfügung. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte massenspektrometrisch mit dem SILAC-Verfahren (stable isotope labelling with amino acids in cell culture). Um die Analysentiefe bei der Proteomuntersuchung zu steigern, wurden die Zellextrakte vor der 2DE parallel entweder mit verschiedenen Affinitätsmatrices (Heparin-Sepharose, Cibacron Blue F3G-A-Sepharose und einer Phosphoprotein-spezifischen Matrix) extrahiert oder einer Fraktionierung in Zellkern und Zytosol unterzogen. Die Proteine aller Fraktionen wurden in verschiedenen pH-Bereichen 2D-elektrophoretisch präpariert und massenspektrometrisch analysiert. Ein Vergleich der Fraktionierungsstrategien ergab, dass die Zellfraktionierung zwar einfacher und schneller durchzuführen war, jedoch eine schlechtere Ausbeute an identifizierten und quantifizierbaren Proteinen erbrachte als die aufwändigere Affinitätsextraktion. Andererseits konnten einige Proteine nur nach der Zellfraktionierung identifiziert werden, sodass beide Verfahren komplementär einzusetzen sind.

Der Vergleich der infektionsbedingten quantitativen Veränderungen bei Transkripten und Proteinen zeigte keinerlei Korrelation. Nur bei 2 der 55 Proteine mit signifikant veränderter Expression konnten auch signifikante quantitative Veränderungen bei den Transkripten festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass posttranslationale Ereignisse bei der Adaption der Wirtszelle an eine PrV-Infektion eine herausragende Bedeutung haben.

Die SILAC-Technik erlaubt nicht nur die Quantifizierung der Expression zelleigener Gene in infizierten und nicht infizierten Zellen, sondern nach entsprechender Anpassung auch die Quantifizierung des Einflusses einzelner viraler Proteine auf die Expression zelleigener oder viraler Proteine. Dies wird erreicht, indem Zellkulturen nach Infektion mit einem PrV-Wildtyp und einer isogenen Deletionsmutante vergleichend analysiert werden. Da in den vorangehenden Untersuchungen mit dem PrV-Wildtyp Hinweise auf infektionsbedingte posttranslationale Ereignisse erhalten worden

waren, wurde als Deletionsmutante PrV- Δ US3 gewählt, in der das Gen für die virale Proteinkinase pUS3 deletiert wurde. Signifikante Unterschiede in der Expression der viralen Proteine pUL29, pUL39 und pUL42 wurden festgestellt, die offensichtlich von pUS3 beeinflusst werden. Keines der drei Proteine wurde bisher als Substrat der pUS3 Kinase beschrieben.

SKIBA *et al.* 2010. Gene expression profiling of pseudorabies virus (PrV) infected bovine cells by combination of transcript analysis and quantitative proteomic techniques. *Vet Microbiol* 143:14-20.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB; Universität Rostock (beide Deutschland)

Untersuchungen zur Ultrastruktur von Pseudorabies und Herpes Simplex-1 Viren

Viele Vertreter der *Alphaherpesviridae*, darunter auch PrV und HSV-1, infizieren Nervenzellen, in denen Latenz ausgebildet wird. Es kann aber auch zur weitergehenden, lebensbedrohlichen produktiven Infektion des Zentralnervensystems kommen. Die genauen Mechanismen dieser Neuroinvasion sind unklar. Wir untersuchen die Grundlagen für dieses Phänomen mittels molekulargenetischer und bildgebender Verfahren (siehe Feature IMB).

MARESCH *et al.* 2010. Ultrastructural analysis of virion formation and anterograde intraaxonal transport of the alphaherpesvirus pseudorabies virus in primary neurons. *J Virol* 84:5528-5539.

NEGATSCH *et al.* 2010. Ultrastructural analysis of virion formation and anterograde intraaxonal transport of the alphaherpesvirus herpes simplex virus in primary rat neurons. *J Virol* 84:13031-13035.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Die Aujeszkyische Krankheit in europäischen Wildschweinen

Das Pseudorabiesvirus (PrV) ist der Erreger der Aujeszkyischen Krankheit (AK) der Schweine, die seit 2003 im deutschen Hausschweinebestand getilgt ist. Allerdings werden PrV-Infektionen weiterhin in Wildschweinen nachgewiesen. Zur Überwachung und Aufrechterhaltung des freien Status der Hausschweine werden PrV-Infektionen im Wildschwein untersucht.

Zwei Fälle von spontaner Aujeszkyischer Krankheit (AK, syn. Pseudowut) beim Europäischen Wildschwein aus dem Land Brandenburg wurden näher untersucht. Beide Tiere fielen durch erhebliche zentralnervöse Störungen auf, u. a. Verlust der natürlichen Scheu, Orientierungslosigkeit sowie Tremor an Kopf und Gliedmaßen, und wurden zum Ausschluss einer möglichen Tollwuterkrankung erlegt. Der Hauptbefund bei den relativ gut genährten, juvenilen (7 - 8 Monate) Tieren bestand in einer nicht-eitrigen Panenzephalitis mit ausgedehnten neuronalen Nekrosen, Nachweis intranukleärer eosinophiler Einschlusskörperchen, Spongiose des Neuropils, Gliose und perivaskulärer Infiltration von Lymphozyten,

Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten. Immunhistochemisch wurde PrV-Antigen in typisch veränderten Hirnlokalisationen nachgewiesen und in beiden Fällen konnte aus Poolproben von Gehirn und Tonsille PrV angezüchtet werden. Die molekularbiologische Charakterisierung der Virusisolate ergab jeweils typische Wildschwein-assoziierte Virusstämme vom PrV Subtyp Iw. Diese Fälle belegen, dass AK sporadisch auch beim Europäischen Wildschwein unter natürlichen Bedingungen vorkommen kann. Einflussfaktoren, wie z. B. Sozialstress, Übergang von passiver zu aktiver Immunität, individuelle genetische Empfänglichkeit für PrV und Umwelteinflüsse, spielen wahrscheinlich für das Auftreten der Erkrankung eine entscheidende Rolle und müssen durch zukünftige experimentelle Untersuchungen ermittelt werden.

PrV kommen beim europäischen Schwarzwild (*Sus scrofa*) häufiger vor als bisher vermutet, denn die Isolierung des Virus gelingt selten und eine Charakterisierung europäischer Isolate war bisher nicht erfolgt. Im Rahmen europäischer Zusammenarbeit konnten insgesamt 35 Schwarzwild-assoziierte Viren aus Deutschland, Frankreich, Spanien, Italien, der Slowakei und Ungarn untersucht werden. Dabei kam neben der klassischen Restriktionsenzymanalyse (RFLP) mit dem Enzym BamH1 auch die vergleichende Sequenzanalyse eines 732 bp großen Fragmentes des Glykoproteingens C (gC), zur Anwendung. Während die RFLP alle bis auf ein Isolat als zugehörig zu Genogruppe I identifizierte, konnte durch die Sequenzanalyse eine größere Diversität nachgewiesen werden. So scheinen Isolate aus Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Frankreich und Spanien einem relativ homogenen Cluster anzugehören. Im Gegensatz dazu bilden Isolate aus Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Sachsen, Baden-Württemberg, der Slowakei, Italien, Ungarn und Frankreich ein anderes, weitaus heterogeneres Cluster.

SCHULZE *et al.* 2010. Spontaneous Aujeszky's disease (pseudorabies) in European wild boars (*Sus scrofa*) in the federal state of Brandenburg, Germany. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 123:359-364.

MÜLLER *et al.* 2010. Characterization of pseudorabies virus of wild boar origin from Europe. Epidemiol Infect 138:1590-1600.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE, IVD und IMB; Forschungsstelle für Jagdkunde und Wildschadenverhütung, Bonn, Landesuntersuchungsämter Rheinland-Pfalz, Berlin-Brandenburg, Sachsen, Sachsen-Anhalt (alle Deutschland); University of Illinois, Urbana-Champaign (USA); State Veterinary Institute, Zvolen (Slowakei), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (Italien); Central Veterinary Institute (NRL), Budapest (Ungarn); OIE RL for Aujeszky's Diseases, Ecole vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort (Frankreich); National Wildlife Research Institute, Ciudad Real (Spanien)

Immunisierung von Schweinen gegen eine Pseudorabiesvirus-Infektion

Obwohl effiziente Lebend- und Totimpfstoffe gegen die AK vorliegen, werden neue Impfkonzeppte entwickelt und evaluiert, die die Vorteile von Lebendimpfstoffen mit den-

jenigen der Totimpfstoffe kombinieren. Hierzu gehören Vektor- und DNA-Impfstoffe. Als vielversprechender Vektor hat sich dabei das zu den Parapockenviren gehörende Orf-Virus herausgestellt. In einem Kombinationsverfahren wurden ein DNA-Impfstoff und ein Orf-Vektor-Impfstoff gegen AK getestet.

Verschiedene prime-boost Immunisierungen wurden mit einer DNA-Vakzine und einer rekombinanten OrfV-Vakzine evaluiert, die beide das Glykoprotein gD des PrV exprimieren. Die beste Immunantwort sowie Schutz gegen PrV-Infektion wurde durch eine DNA-Immunisierung gefolgt von einer Immunisierung mit der ORFV-Rekombinanten vermittelt. Die Ergebnisse zeigen das Potential dieser heterologen, auf nur einem viralen Glykoprotein basierenden prime-boost Vakzinierung gegen die Aujeszkysche Erkrankung des Schweines.

VAN ROUJ *et al.* 2010. Comparison of different prime-boost regimes with DNA and recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs. Vaccine 29:1808-1813.

Central Veterinary Institute of Wageningen UR, Lelystad (Niederlande); Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (Brasilien); Friedrich-Loeffler-Institut, IfI (Deutschland)

1.1.1.2 BOVINES HERPESVIRUS TYP 1

Eine neue, markierte BoHV-1-Lebendvakzine mit einem Ko-Polymer als Adjuvans

Bei der Bekämpfung der Bovinen Herpesvirusinfektion vom Typ 1 (BoHV-1) sind gE-deletierte Impfstoffe unerlässliche Werkzeuge. Dabei sind Lebendvakzinen eher für naive, junge Tiere geeignet, während sogenannte Reagenten besser mit inaktivierten Impfstoffen vakziniert werden, um die Gefahr einer Virusreaktivierung zu minimieren. Kürzlich publizierte Rekombinationsexperimente zeigen zudem, dass Lebendvakzine das Risiko der Rekombination mit Wildtypviren bergen, so dass selbst bei erhaltener gE-Deletion die Attenuierung aufgehoben werden könnte.

Es stellte sich daher die Frage, ob sich diese Eigenschaften kombinieren lassen. Es wurde daher eine Doppeldeletionsvariante des BoHV-1 auf Basis eines infektiösen BAC-Klons hergestellt (delta gE und delta TK) und mit einem nicht-viruziden Adjuvans gemischt.

Die Immunisierungs- und Challengeexperimente konnten zeigen, dass die neue Vakzineformulierung sehr effizient ist und vermutlich einen den bisherigen Markervakzinen überlegenen Schutz vor BoHV-1-Replikation und -Ausscheidung bieten kann.

KALTHOFF *et al.* 2010. Immunization and challenge experiments with a new modified live bovine herpesvirus type 1 marker vaccine prototype adjuvanted with a co-polymer. Vaccine 28:5871-5877.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD

Glykoprotein B-vermittelter Protein Display in der Hülle des bovinen Herpesvirus Typ 1

Das Glykoprotein B (gB) des bovinen Herpesvirus Typ 1 (BoHV-1) ist eine Hauptkomponente der Virushülle und für Membranfusionsvorgänge bei der Infektion von Zellen und der direkten Virusausbreitung von Zelle zu Zelle absolut notwendig. Das gB Vorläuferprotein wird im trans-Golgi-Netzwerk durch die Proprotein-Convertase Furin gespalten, wonach die entstehenden Untereinheiten durch Disulfidbrücken kovalent verbunden bleiben. Die Integration eines offenen Leserahmens für ein modifiziertes gB mit einer zweiten Furinspaltstelle und dazwischen eingebettetem reifen bovinem alpha-Interferon (boIFN- α) führte zur Isolierung der Rekombinanten BHV-1/gB2FuIFN- α die, anders als erwartet, gB mit einer vergrößerten aminoterminalen Untereinheit exprimierte. Die Neutralisation von BoHV-1/gB2FuIFN- α durch monospezifische Antikörper gegen boIFN- α und die Induktion eines antiviralen Zustands durch inaktivierte Virionen zeigte, dass boIFN- α nicht von der aminoterminalen gB Untereinheit abgespalten wurde und auf der Oberfläche von Virionen exponiert vorliegt. Zur Bestätigung, dass BoHV-1 gB geeignet ist, Glykoproteine auf der Oberfläche von Virionen zu präsentieren, wurden BoHV-1 Rekombinanten generiert, die die ersten 273 Aminosäuren der aminoterminalen Untereinheit HA1 des Hämagglutins (HA) des aviären Influenzavirus innerhalb des gB enthielten. Die resultierende Rekombinante BoHV-1/gB2FuHA1 exprimierte gB, von dem das 55kDa HA1 abgespalten und sekretiert wurde, während bei der Rekombinanten BHV-1/gB_NH2HA1 das HA1 mit der aminoterminalen gB Untereinheit verbunden blieb. Western Blot Analysen und Neutralisationstest ergaben, dass HA1 als Fusionsprotein mit gB in Virionen nach außen exponiert vorlag. Diese Technik des Proteindisplay ist für die Entwicklung neuer Impfstoffe und neuartiger Diagnostika zur sogenannten Pseudopartikel-Neutralisierung verwendbar, die auch die Untersuchung von Antikörpern gegen BSL 3 und BSL 4 Pathogene unter BSL 2 Bedingungen ermöglicht.

Keil et al. 2010. Protein display by bovine herpesvirus type 1 glycoprotein B. *Vet Microbiol* 143:29-36.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB

Die Expression des Kapsidvorläuferproteins und der 3C Protease des Maul- und Klauenseuche Virus beeinflusst die Replikation des bovinen Herpesvirus 1

Die Expression des Maul- und Klauenseuche Virus (MKSV) Kapsidvorläuferproteins P1-2A und der 3C Protease resultiert in korrekter Prozessierung des Vorläuferproteins und der Bildung von Kapsidstrukturen, die in damit geimpften Tieren Schutz gegen eine MKSV Belastungsinfektion induzieren. Versuche, bovine Herpesvirus Typ 1 (BoHV-1) Rekombinanten, die eine Expressionskassette für P1-2A/3C oder für die 3C Protease enthalten, zu isolieren, waren wiederholt ohne Erfolg. Allerdings konnten Rekombinanten, die

P1-2A oder eine inaktive 3C Protease exprimierten, isoliert werden. Letztere vermehrte sich *in vitro* wie Wildtyp BoHV-1, während BoHV-1/P1-2A einen Defekt in der direkten Ausbreitung von Zelle zu Zelle sowie in der Virusfreisetzung aufwies. Diese Ergebnisse zeigten, dass sich BoHV-1 nicht als viraler Vektor für die auf P1-2A/3C basierende Immunisierung gegen MKS eignet.

KLOPFLEISCH *et al.* 2010. Effect of foot-and-mouth disease virus capsid precursor protein and 3C protease expression on bovine herpesvirus 1 replication. *Arch Virol* 155:723-731.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB (Deutschland); Imperial College, London (UK)

1.1.1.3 HERPES SIMPLEX VIRUS TYP 1 (HSV-1)

Rekrutierung von zellulären Proteinen des Motorkomplexes durch Herpes simplex Virus 1 (HSV-1)

Viele Viren, auch das neurotrope Alphaherpesvirus Herpes simplex Virus 1 (HSV-1), werden entlang der Mikrotubuli der Wirtszelle durch zelluläre Motorproteine zu ihrem Ziel innerhalb der Zelle transportiert. Um die Mechanismen zu verstehen, die es HSV-1 erlauben, den Mikrotubulitransport in beiden möglichen Richtungen zu nutzen, wurde untersucht, welche zellulären Motorproteine mit Strukturkomponenten des HSV-1 Partikels interagieren. In einer Zusammenarbeit mit der Medizinischen Hochschule Hannover wurden dazu gereinigte reife HSV-1 Partikel zunächst unter verschiedenen Bedingungen ihrer Hülle und Teilen ihres Teguments beraubt, hinsichtlich ihrer Zusammensetzung elektronenmikroskopisch, durch Immunblot oder massenspektrometrisch genau charakterisiert und schließlich die Aufnahmefähigkeit der verschiedenen nunmehr exponierten Partikeloberflächen für Bestandteile des Motorkomplexes geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass Kapside, deren Oberfläche von den inneren Tegumentproteinen pUS3, pUL36, pUL37, ICP0, pUL14, pUL16 und pUL21 gebildet wird, die zellulären Motorproteine Dynein, Dynactin, Kinesin-1 und Kinesin-2 binden können. Im Gegensatz dazu waren weder völlig detegumentierte Viruspartikel, die nur noch die Kapsidproteine VP5, VP26, pUL17 und pUL25 exponierten, noch Kapside, die von den äußeren Tegumentproteinen wie vhs, pUL11, ICP4, ICP34.5, VP11/12, VP13/14, VP16, VP22 oder pUS11 bedeckt waren, dazu in der Lage. Demnach rekrutieren verschiedene Strukturproteine des HSV-1 die Bestandteile des Motorkomplexes. Unklar ist, wie die Bewegungsrichtung des Kapsids gesteuert wird, da auf einzelnen Kapsiden Bestandteile des Motorkomplexes nachgewiesen wurden, die eine Bewegung in beide Richtungen ermöglichen.

RADTKE *et al.* 2010. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog* 6(7), doi:10.1371/journal.ppat.1000991

Medizinische Hochschule Hannover; Friedrich-Loeffler-Institut, IMB

1.1.1.4 HERPES SIMPLEX VIRUS 2 (HSV-2)

Molekularepidemiologische Untersuchungen zu Herpes simplex-Virus Typ 2

Basierend auf den DNA-Sequenzen der Glykoproteingene gE, gG und gI wurden zwei Herpes simplex-Virus Typ 2 (HSV-2) clades (A und B) beschrieben. Zur molekularen Typisierung der in Deutschland zwischen 1997 und 2008 zirkulierenden HSV-2 Wildtypstämme wurde ein neues Verfahren auf der Basis der Komplettssequenzierung der offenen Leserahmen der Glykoproteine B (gB) und gG eingesetzt. Auf der Basis der phylogenetischen Analyse der gB-kodierenden DNA-Sequenz wurden 8 von 64 (12 %) Isolaten als clade A-Stämme und 56 von 64 (88 %) Isolaten als clade B-Stämme klassifiziert. Die Analyse der gG-kodierenden DNA-Sequenz resultierte in der Klassifikation von 4 (6 %) Isolaten als clade A-Stämme und von 60 (94 %) Isolaten als clade B-Stämme. Die unterschiedliche Klassifizierung von 8 Isolaten auf der Basis der gB- und gG-Sequenzanalysen deutet auf das Vorliegen von intergenischen Rekombinationsereignissen hin. Dagegen gab es keine Hinweise für intragenische Rekombinationsereignisse.

SCHMIDT-CHANASIT *et al.* 2010. A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany. *J Clin Virol* 48:208-211.

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg; Friedrich-Loeffler-Institut, INNT; Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

1.1.1.5 INFEKTIÖSES LARYNGOTRACHEITIS VIRUS

In-vitro- und *In-vivo*-Charakterisierung Glykoprotein C negativer Rekombinanten des Virus der infektiösen Laryngotracheitis

Die infektiöse Laryngotracheitis ist eine ökonomisch bedeutende Atemwegserkrankung der Hühner, die durch ein Alphaherpesvirus (ILTV, *Gallid herpesvirus 1*) hervorgerufen wird. Für die Entwicklung geeigneter Impfstoffe und Diagnostika sind vor allem die Glykoproteine der Herpesvirus-Hülle von Interesse, da sie die wichtigsten Ziele der humoralen Immunantwort des Wirtes darstellen. Als eines der Hauptantigene an der Oberfläche von ILTV Virionen wurde das bei Alphaherpesviren konservierte, N-glykosylierte Hüllprotein gC identifiziert. Um die Funktion von gC genauer zu untersuchen, wurde nach Kotransfektion empfänglicher Hühnerzellkulturen mit genomischer ILTV DNA und gezielt mutierten plasmidklonierten Genomfragmenten eine gC negative Virusrekombinante (ILTV-ΔgC) und aus dieser wiederum eine gC Revertante (ILTV-gCR) hergestellt. Wie die gC-Homologen anderer Alphaherpesviren erwies sich auch ILTV gC als nicht essentiell für die Virusreplikation. In Zellkultur zeigte ILTV-ΔgC gegenüber dem Wildtypvirus und ILTV-gCR zwar eine verzögerte Penetration und geringfügig kleinere Plaques, jedoch waren die Virustiter nicht signifikant re-

duziert. Tierversuche belegten, dass ILTV-ΔgC in Hühnern erkennbar attenuiert ist. Allerdings führte die intratracheale Infektion mit hohen Dosen von ILTV-ΔgC noch bei ca. 20 % der Tiere zum Tode, wogegen das Wildtypvirus und ILTV-gCR 50 % Mortalität verursachten. Trotz der Deletion eines Hauptantigens und der Abschwächung von ILTV-ΔgC waren die angeborene und die adaptive Immunantwort der Tiere gegen dieses Virus nicht reduziert, sondern verstärkt, sodass überlebende Hühner vollständig gegen Belastungsinfektionen geschützt waren. Möglicherweise könnten deshalb aus ILTV-ΔgC durch Deletion weiterer Virulenzfaktoren Markerimpfstoffe gewonnen werden, die eine serologische Unterscheidung geimpfter und Feldvirus-infizierter Tiere erlauben, da in letzteren reproduzierbar gC-spezifische Antikörper nachweisbar sind.

PAVLOVA *et al.* 2009. *In vitro* and *in vivo* characterization of glycoprotein C-deleted infectious laryngotracheitis virus. *J Gen Virol* 91:847-857.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

1.1.2 Familie *Alloherpesviridae*

Das erst vor etwa zehn Jahren entdeckte Koi Herpesvirus (KHV, Cyprinid Herpesvirus 3) gehört in die neue Familie *Alloherpesviridae* der Ordnung *Herpesvirales*. Bedingt durch den regen Zierfischhandel tritt die KHV-Infektion mittlerweile fast weltweit bei Kois und Nutzkarpfen auf. Sie verursacht schwere Erkrankungen, die durch Haut- und Kiemenläsionen sowie durch zentralnervöse Störungen gekennzeichnet sind und zu Massensterben in den Beständen führen können. Zur Bekämpfung stehen bislang keine sicheren Impfstoffe und nur wenige diagnostische Hilfsmittel zur Verfügung.

Untersuchungen zur Empfänglichkeit von Cypriniden für das Koi-Herpesvirus

Die KHV-Infektion tritt fast weltweit bei Kois und Nutzkarpfen auf. Die Empfänglichkeit anderer Cypriniden sowie ihre Rolle bei der Verbreitung des KHV wurden in verschiedenen Studien untersucht.

In einem Langzeitversuch wurden Kois (*Cyprinus carpio*) und Goldfische (*Carassius auratus auratus*) über Bad und durch intraperitoneale (i. p.) Applikation mit KHV infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde in einem Zeitraum von 60 Tagen nach der Infektion (p. i.) in separierten Leukozyten und Organen dieser Fische KHV-Antigen bzw. -Genom mittels Fluoreszenztechniken, PCR und *In-situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass bei den KHV-infizierten Tieren eine Verminderung der Anzahl weißer Blutkörperchen (Leukopenie) ausgelöst wird, die beim Koi etwa 20 Tage, beim Goldfisch wesentlich länger (> 45 Tage) anhält. Nach 60 Tagen wurden die KHV-infizierten, aber klinisch gesunden Goldfische zu naiven Kois gesetzt.

30 Tage nach dem Zusammensetzen konnte das KHV auch in den Kontakttieren detektiert werden. Damit wurde bestätigt, dass der Goldfisch eine für das KHV, nicht aber für die Krankheit empfängliche Spezies ist.

In weiteren Untersuchungen erkrankten Kreuzungen von Karpfen mit Goldfisch (*Cyprinus carpio* x *Carassius auratus*) bzw. Karausche (*Cyprinus carpio* x *Carassius carassius*) nach Badinfektion an einer KHV-Infektion. Während die Hybride von Karpfen und Goldfischen nur zum Teil an der KHV-Infektion erkrankten und verendeten (35 % Mortalität), starben mehr als 90% der Hybride von Karpfen und Karauschen mit deutlicher Klinik. In allen überlebenden Hybriden konnte das KHV mittels PCR nachgewiesen werden. Serologische Untersuchungen zum indirekten Nachweis des KHV wurden durchgeführt.

BERGMANN *et al.* 2010. Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). *J Fish Dis* 33:267–272.

BERGMANN *et al.* 2010. Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 30:74–84.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED und ATB; Universität Greifswald; Universität Szczecin (Polen)

Untersuchungen zur Sensitivität empfohlener diagnostischer PCRs zum Nachweis des Koi-Herpesvirus

Mit Proben von sicher KHV-infizierten, aber gesund erscheinenden Karpfen werden häufig negative Ergebnisse beim Nachweis des Virus bzw. dessen viraler DNA erzielt. Ursache hierfür ist die unterschiedliche Sensitivität diagnostischer PCRs zum Nachweis des KHV. Zur Ermittlung der Sensitivität der diagnostisch eingesetzten Methoden wurden Viruspools und KHV-Plasmid-Präparationen mit bekannter Konzentration (Viren und DNA) hergestellt und geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die vom OIE empfohlenen PCRs nicht die notwendige Sensitivität zum Nachweis des KHV in latent infizierten Tieren besitzen. Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass die kommerziell angebotene „Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)“ nicht ausreichend sensitiv zum Nachweis des KHV in latent infizierten Tieren ist.

Eine neue, sehr sensitive semi-nested PCR zum alternativen Nachweis des KHV in einer „one-tube“- Reaktion wurde etabliert und vergleichend zur real-time PCR geprüft.

Bei der Untersuchung von Praxis-Proben konnte festgestellt werden, dass die PCR nach Bercovier *et al.* (2005) negativ ausfallen kann, wenn im Vergleich durchgeführte andere PCRs ein positives Ergebnis aufweisen. In der real-time PCR nach Gilad *et al.* (2004) erwies sich die Verwendung von Sammelproben im Vergleich zu Einzelproben als wenig vorteilhaft.

BERGMANN *et al.* 2010. Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. *J Virol Meth* 163:229–233.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED; Universität Taipeh (Taiwan); Universität Szczecin (Polen)

Untersuchungen von Invertebraten (Muscheln, Kleinkrebse) als mögliche Überträger des Koi-Herpesvirus

Bei Untersuchungen von Süßwasser-Muscheln (*Anodonta cygnea*) und Kleinkrebsen (*Gammarus pulex*) aus Teichen, in denen Karpfen eine KHV-Infektion überstanden hatten, zeigte sich, dass auch diese Invertebraten das KHV beherbergen bzw. weitergeben können. Mittels PCR gelang es, das KHV bei beiden Spezies nachzuweisen. Während das KHV in den Organen (Verdauungsdrüsen, Mantel- und Kiementeile) der Muscheln nachweisbar war, wurden die Kleinkrebse in toto untersucht. Daher kann bei den Krebsen eine äußerliche Kontamination mit KHV aus dem umgebenden Wasser nicht ausgeschlossen werden.

KIŁPINSKI *et al.* 2010. Detection of KHV in Freshwater Mussels and Crustaceans from Ponds with KHV History in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Isr J Aquacult - Bamidgah* 62:28–37.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED; Universität Szczecin (Polen)

1.2 RNA VIREN

1.2.1 Familie *Reoviridae*

Die Familie der *Reoviridae* umfasst unbehüllte Viren mit ikosaedrischem Kapsid und einem Durchmesser von 60 – 80 nm. Reoviren kommen im Tierreich weit verbreitet vor (Säugetiere, Reptilien, Fische, Krustentiere und Insekten). Drei Gattungen umfassen Pflanzenviren. Das Genom besteht aus doppelsträngiger RNA (dsRNA) aus je nach Gattung zehn bis zwölf Segmenten.

1.2.1.1 ORBIVIREN

Orbiviren besitzen ein dsRNA-Genom aus zehn Segmenten. Die Übertragung zwischen den Vertebratenwirten findet durch eine Reihe Blut saugender Insekten (Gnizen) statt. Zu den Orbiviren gehören die Erreger der Blauzungkrankheit (BTV), der afrikanischen Pferdepest (AHSV) und der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche (EHD). Vom BTV sind bislang mindestens 24 verschiedene Serotypen mit unterschiedlicher Virulenz bekannt. Die Krankheit betrifft Wiederkäuer wie z. B. Schafe, Rinder und Ziegen, aber auch Wildwiederkäuer. Die Blauzungkrankheit ist eine anzeigepflichtige Tierseuche. Für den Menschen besteht keine Ansteckungsgefahr, weshalb Fleisch- und Milchprodukte ohne Bedenken verzehrt werden können.

Virus der Blauzungkrankheit (BTV)

Weitere Untersuchungen zu inaktivierten Impfstoffen gegen den Serotyp 8 der Blauzungkrankheit (BTV-8) wurden durchgeführt. Nachdem die unmittelbare Sicherheit und Wirksamkeit der in Deutschland eingesetzten Impfstoffe im

Rahmen einer Feldstudie bestätigt worden waren, wurden weitere Aspekte der BTV-8-Impfung untersucht. Einerseits wurde die Schutzwirkung der BTV-Impfstoffe ein Jahr nach Impfung untersucht. Andererseits wurden vergleichende Analysen zur Etablierung eines Infektionsmodells auf Basis Zellkultur-adaptierter BTV-8 durchgeführt.

Darüber hinaus wurden im letzten Jahr weitere Forschungsergebnisse im Zusammenhang mit dem Auftreten von BTV-6 im Winter 2008 publiziert. Dies umfasste die epidemiologische und tierexperimentelle Aufarbeitung des BTV-6-Geschehens in Deutschland. Darüber hinaus war das NRL an der Gesamtsequenzierung von BTV-6 durch das Gemeinschaftsreferenzlabor für BTV der EU (CRL-BT) in Pirbright beteiligt.

ESCHBAUMER *et al.* 2010. Infectious blood or culture-grown virus: A comparison of bluetongue virus challenge models. *Vet Microbiol* 146:150-154.

WÄCKERLIN *et al.* 2010. Evaluation of humoral response and protective efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 one year after vaccination of sheep and cattle. *Vaccine* 28:4348-4355.

MAAN *et al.* 2010. Full genome characterisation of bluetongue virus serotype 6 from the Netherlands 2008 and comparison to other field and vaccine strains. *PLoS ONE* 5(4):e10323.

ESCHBAUMER *et al.* 2010. Emergence of bluetongue virus serotype 6 in Europe-German field data and experimental infection of cattle. *Vet Microbiol* 143:189-195.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IfE; LAVES, Veterinärinstitut Oldenburg (alle Deutschland); Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Woking (UK); Central Veterinary Institute, Lelystad (Niederlande); Onderstepoort Veterinary Institute (Südafrika); Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo (Italien)

1.2.1.2 ROTAVIREN

Rotaviren besitzen ein dsRNA-Genom aus elf Segmenten. Die komplexen Viruspartikeln bestehen aus zwei Kapsidlagern und einer inneren Corestruktur, die auch als dreischichtige Kapsidstruktur bezeichnet wird. Rotaviren wurden erstmals in den 1950er-Jahren als Erreger einer Diarrhoe bei der Maus identifiziert, seither werden sie bei zahlreichen Säugetieren und Vögeln gefunden. Rotaviren sind genetisch sehr variabel, weshalb mehrere Genogruppen und Genotypen unterschieden werden können. Für den Menschen sind 3 Genogruppen und innerhalb der Genogruppe A besonders 4 Genotypen bekannt, die man als Humane Rotaviren zusammenfasst. Für die Landwirtschaft sind insbesondere Rotavirusinfektionen bei Jungtieren wie Ferkeln, Fohlen und Kälbern von Bedeutung.

Unterschiede und Ähnlichkeiten im Genom von Rotaviren Gruppe A und D

Rotaviren der Gruppe A sind als einer der wichtigsten Durchfallerreger bei Tier und Mensch von Bedeutung. Auf der Basis der Struktur des Genomsegmentes 6 sowie der

Antigenität des kodierten Virusproteins (VP) werden Rotaviren in die Gruppen A bis G eingeteilt. Während Rotaviren der Gruppen A, B und C bei Mensch und Tieren vorkommen, werden Rotaviren der Gruppe D nur bei Vogelarten gefunden. Obwohl Viren dieser Gruppe weit verbreitet sind, gibt es bisher keine Daten zur Nukleotidsequenz ihres Genoms. In diesem Projekt wurde erstmals das komplette Genom eines aviären Rotavirus-Isolates (05V0049) der Gruppe D mittels Random-Primer-PCR sequenziert. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von Struktur- und Nichtstrukturproteinen VP1 bis VP4, VP6, VP7, und NSP1 bis NSP5 zwischen dem Rotavirus-Isolat 05V0049 und von Rotaviren der Gruppen A, B und C ergab folgende Identitäten: 12,3 bis 51,7 %, 11,0 % bis 23,1 % und 9,5 % bis 46,9 %. Die phylogenetische Analyse zeigte, dass Rotaviren der Gruppen A, C und D offenbar genetisch enger verwandt sind als mit Rotaviren der Gruppe B. Die terminalen Nukleotidsequenzen aller 11 Genomsegmente von Rotaviren der Gruppe A und D sind identisch. In weiteren Untersuchungen ist zu prüfen, ob ein Rearrangement zwischen Rotaviren der Gruppen A und D möglich ist.

TROJNAR *et al.* 2010. The Genome Segments of a Group D Rotavirus Possess Group A-Like Conserved Termini but Encode Group-Specific Proteins. *J Virol* 84:10254-10265.

Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ; Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin; Freie Universität Berlin, Novartis Vaccines and Diagnostics GmbH Co. KG, Marburg (alle Deutschland)

1.2.2 Familie *Rhabdoviridae*

Zu dieser Familie gehören behüllte Viren mit einem unsegmentierten RNA-Genom von negativer Polarität. Tierpathogene Rhabdoviren haben eine typische geschossförmige Gestalt mit einer Länge von 100-430 nm und einem Durchmesser von 45-100 nm. Vertreter dieser Familie haben ein sehr breites Wirtsspektrum, wobei einige nur in Säugetieren, Vögeln, Fischen, Arthropoden oder anderen wirbellosen Tieren replizieren. Viele replizieren allerdings sowohl in Arthropoden als auch in Wirbeltieren und werden daher zu den Arboviren gezählt. Weitere Vertreter infizieren sowohl Pflanzen als auch sich von Pflanzen ernährenden Insekten.

1.2.2.1 LYSSAVIREN

Der typische Vertreter dieser Gattung ist der Erreger der Tollwut (**Tollwutvirus, Rabies-Virus**). Für 11 von 12 bislang bekannten Lyssaviren sind Fledermäuse das Hauptreservoir. Rabies Virus (RABV) umfasst den weltweit vorkommenden Erreger der „klassischen Tollwut“ mit Karnivoren als Hauptreservoir. Lagos bat virus (LBV); Mokola virus (MOKV); Duvenhage virus (DUVV); European bat lyssavirus 1 & 2 (EBLV-1 & 2); und Australian bat lyssavirus (ABLV) kommen nur in bestimmten geographischen Regionen vor. Auch Aravan

Virus (ARV), Khujand Virus (KHUV), Irkut Virus (IRKV) und West Caucasian Bat Virus (WCBV) sind bisher nur aus einzelnen Fledermäusen in Asien isoliert worden. Bis auf IRKV ist für die letztgenannten bisher keine humane Infektion nachgewiesen worden. Für das jüngst isolierte Shimoni bat virus (SHIBV) steht eine Klassifizierung als neue Viruspezies noch aus.

Validierung einer wenig invasiven Blutentnahmetechnik für die Tollwutserologie unter Nutzung von Raubwanzen (Triatominae, Hemiptera)

Im Rahmen serologischer Studien zum Nachweis Tollwut-spezifischer Antikörper ist die Anwendung klassischer Blutentnahmetechniken insbesondere bei kleinen oder geschützten Säugern wie z. B. Fledermäusen sehr schwierig. Daher wurde die Nützlichkeit einer alternativen, weniger invasiven Blutentnahmetechnik durch Verwendung blutsaugender Raubwanzen (*Dipetalogaster maximus* und *Rhodnius prolixus*) im Tierversuchsmodell an gegen Tollwut geimpften NMRI-Mäusen (*Mus musculus*) näher untersucht. Die Blutentnahme durch Raubwanzen wurde im Vergleich zu konventionellen (retro-orbitalen) Blutentnahmetechniken durch Bestimmung Virus-neutralisierender Antikörper (VNA)-Titer an paarweisen Blutproben derselben Tiere verglichen. Dabei wurde insbesondere die Genauigkeit (Methodenvergleich), die Präzision (Wiederholbarkeit der Ergebnisse) sowie die Robustheit (Einfluss der Verdauung auf die Blutparameter) der Raubwanzenmethode evaluiert. Die gemessenen VNA-Titer beider Methoden an paarweisen Blutproben von denselben Tieren unterschieden sich nicht. Auch wurden keine signifikanten Unterschiede in Blutproben gefunden, die von verschiedenen Raubwanzen von ein und demselben Tier genommen und getestet wurden. Das gleiche galt für VNA-Titer von Blutproben von Triatomine Raubwanzen, die bis zu 4 Stunden nach dem Saugakt entnommen wurden. Die Studie belegt, dass die Verwendung von blutsaugenden Raubwanzen eine alternative Möglichkeit zur Blutentnahme im Rahmen serologischer Studien zum Nachweis Tollwut-spezifischer Antikörper bieten könnte. Diese Methode hat gegenüber konventionellen Blutentnahmetechniken insbesondere bei Kleinsäufern (Fledermäuse) vor dem Hintergrund begrenzter Möglichkeiten der Punktion entsprechender Venen sowohl aus technischer Sicht als auch unter tierschützerischen Aspekten entscheidende Vorteile.

Vos *et al.* 2010. Validation of a less-invasive blood sampling technique in rabies serology using Reduviid bugs (Triatominae, Hemiptera). *J Zoo Wildl Med* 41:62-67.

IDT-Biologika GmbH, Roßlau, Friedrich-Loeffler-Institut, IfE, Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin (alle Deutschland)

Evaluierung eines kommerziellen Tollwut ELISA als Ersatz für Serumneutralisationstests im Rahmen des Pet Travel Schemes und der oralen Immunisierung von Füchsen

Die EU Verordnung 998/2003 fordert für das nicht kommerzielle Verbringen von Tollwut-geimpften Hunden und Katzen zwischen bestimmten EU Mitgliedsstaaten sowie bei Import aus nicht gelisteten Drittländern eine serologische Testung mittels Neutralisationstest durch zugelassene Laboratorien. Serumneutralisationstests werden auch für die Überprüfung der Effektivität von oralen Tollwutimmunisierungskampagnen in Wildtierpopulationen verwendet. In der vorliegenden Studie wurde ein OIE-gelisteter kommerzieller Tollwut-ELISA als Alternative zu Serumneutralisationstests sowohl für die serologische Testung von Hunde- und Katzenserum im Rahmen des *Pet Travel Schemes* als auch des Monitorings von oralen Tollwutimmunisierungskampagnen evaluiert. Die Analyse von Hunde- und Katzenserum mittels ELISA ergab eine Sensitivität gegenüber den serologischen Standardtestverfahren von 44,4–88,9 % in Abhängigkeit der verwendeten Berechnungsmethode. Bei Fuchsserum aus Impfgebieten lag die Sensitivität im Vergleich zum Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) bei nur 32,4% (95% KI: 24,8–40,0 %). Im gegenwärtigen Design kann der ELISA herkömmliche serologische Standardverfahren im Rahmen des *Pet Travel Schemes* sowie für das Monitoring von oralen Tollwutimmunisierungskampagnen nicht ersetzen. Die Ergebnisse gleichen denen eines anderen kommerziellen, für die gleiche Zielstellung evaluierten Tollwut-ELISAs und könnten somit ein allgemeines Missverständnis in der Tollwutserologie (bindende vs. Neutralisierende Antikörper) veranschaulichen und nicht ein Fehlschlagen dieses ELISA Tests per se. Darüber hinaus sind gesetzgebende Probleme im Zusammenhang mit der serologischen Testung von Hunde- und Katzenserum im Rahmen des *Pet Travel Schemes* dringend zu lösen, um den Einsatz von ELISAs in Zukunft zu rechtfertigen und zu gewährleisten.

KNOOP *et al.* 2010. Evaluation of a commercial rabies ELISA as a replacement for serum neutralization assays as part of the pet travel scheme and oral vaccination campaigns. *Berl Münch Tierarztl Wochenschr* 123:278-85

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Friedrich-Loeffler-Institut, IfE (beide Deutschland)

Entwicklung einer verbesserten TaqMan real time PCR zum Nachweis klassischer Tollwutviren unter Verwendung einer „double check“ Strategie

Molekularbiologische Testverfahren nehmen eine immer wichtigere Rolle in der Diagnostik anzeigepflichtiger Tierseuchen ein. PCR basierte Diagnostik wird bei der Tollwut derzeit von der WHO und der OIE nicht als Standardverfahren in der Routinediagnostik empfohlen, da es robuste Alternativen (FAT, RTCIT) gibt und die Verlässlichkeit dieser Methoden in Labors mit geringerem Qualitätsstandard in

Frage gestellt wird. Trotzdem werden zahlreiche tollwut-spezifische RT-PCRs im internationalen Rahmen in vielen Labors zur schnellen Bestätigung, Abklärung von Verdachtsfällen oder zur *Intra-vitam*-Diagnostik beim Menschen eingesetzt. Der Tollwutringversuch 2010 sollte erstmals auch dazu dienen, Informationen zum derzeitigen Stand der Verfügbarkeit und des Einsatzes molekularer Diagnostikmethoden (RT-PCR) zu erheben. Demnach haben nur wenige Untersuchungseinrichtungen konventionelle oder Real-time PCRs etabliert. Um eine einheitliche standardisierte molekulare Tollwutdiagnostik in Deutschland zu gewährleisten, haben wir eine RABV-spezifische TaqMan® Real-time PCR entwickelt, welche im Rahmen internationaler Kooperationen an mehr als 200 Tollwutvirusisolaten aus unterschiedlichen Regionen der Welt erfolgreich getestet wurde. Die Kombination zweier unabhängiger Zielregionen für Primer und Sonden ('double check' Strategie) ermöglicht es dabei, alle verschiedenen Tollwutvirusvarianten zu detektieren, und gibt zudem eine größere Sicherheit, dass bisher nicht beschriebene RABV-Varianten auch erkannt werden können. Zusätzlich wurde die Sicherheit des Testverfahrens durch die Verwendung einer modifizierten, künstlich hergestellten Positivkontrolle (LPC R13 /R14) erhöht, da eine Kontamination nun eindeutig als solche identifiziert werden kann. Eine ähnliche Vorgehensweise wird gegenwärtig für die europäischen Fledermaustollwutviren EBLV-1 und -2 entwickelt.

HOFFMANN *et al.* 2010. Improved safety for molecular diagnosis of classical rabies viruses by use of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR „double check“ strategy. *J Clin Microbiol* 48:3970-3978.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD und IfE (Deutschland) Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge (UK); DTU National Veterinary Institute, Lindholm (Denmark)

Molekulare Charakterisierung von Tollwutviren in Rumänien

Die Tollwut ist in Rumänien seit der Antike bekannt. Während bis in das 19. Jahrhundert vorwiegend die Hundetollwut verbreitet war, wird die derzeitige Tollwutepidemie durch den Fuchs vermittelt. In den letzten Jahren ist die Diversität der Tollwutviren in anderen Regionen des Balkan intensiver untersucht worden, Rumänien blieb aber bis dato ein „weißer Fleck“. Die phylogenetische Untersuchung der Sequenzen des partiellen N-Gens von 64 Tollwutvirusisolaten zeigte, dass sie der „Cosmopolitan lineage“ zuzuordnen sind. Interessanterweise konnte eine sehr hohe Diversität nachgewiesen werden und sechs unterschiedliche genetische Varianten wurden identifiziert, wobei zwei bisher nicht in anderen Ländern gefunden wurden. Ursache dieser Heterogenität könnten sowohl die grenzüberschreitenden Wanderungen infizierter Füchse sein, als auch die geografische Isolierung historischer Viruslinien, die zu früheren Epidemien führten.

TURCITU *et al.* 2010. Molecular epidemiology of rabies virus in Romania provides evidence for a high degree of heterogeneity and virus diversity. *Virus Res* 150:28-33.

Institute for Diagnosis and Animal Health, National Reference Laboratory for Rabies, Faculty of Veterinary Medicine, Splaiul (beide Bukarest, Rumänien); Friedrich-Loeffler-Institut, IfE (Deutschland); Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, (UK)

Entwicklung eines harmonisierten Ansatzes zum Monitoring und zur Berichterstattung der Tollwut innerhalb der Europäischen Union

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) ist auch für die Datensammlung und Auswertung von gemeldeten Zoonoseerregern innerhalb der EU verantwortlich. Um dies in Bezug auf Tollwut zu verbessern, wurde ein Projekt ausgeschrieben, (CFP/EFSA/ZOON/2008/01) in dessen Rahmen ein harmonisierter Ansatz zum Monitoring und zur Berichterstattung der Tollwut innerhalb der EU entwickelt werden sollte. Es stellte sich heraus, dass trotz verschiedener Empfehlungen durch internationale Organisationen die Vorgaben für die Tollwutsurveillance und die Meldungen innerhalb der Mitgliedsstaaten stark variierten. Basierend auf vorhergehenden Studien wurde festgehalten, dass ein adäquates System der Tollwutsurveillance unabhängig vom jeweiligen Status aufrechterhalten werden sollte. Der Fokus sollte dabei auf Indikatortieren liegen und die Untersuchungen sollten sich gleichmäßig über das jeweilige Land verteilen. Zusätzlich sollte in den Mitgliedsländern auch eine Surveillance der Fledermaustollwut etabliert werden. Um Mehrarbeit zu vermeiden und die Meldemoral insgesamt zu verbessern, wurde empfohlen, das bereits am FLI etablierte Meldesystem über das Rabies Bulletin Europe als Grundlage für die Meldepflicht zur EFSA zu nutzen.

CLUQUET *et al.* 2010. Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the European Union. Scientific Report submitted to EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/67e.pdf>).

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE (Deutschland); ANSES, Nancy (Frankreich); Veterinary Laboratories Agency (VLA); Weybridge (UK); Central Veterinary Institute, Wageningen (Niederlande); National Veterinary Research Institute (NVRI), Pulawi (Polen)

Herstellung von rekombinanten Fledermaus Lyssaviren

Neben klassischen Tollwutviren stellen auch Fledermaus-Lyssaviren eine mögliche Quelle für die Infektion von terrestrischen Säugern und die damit verbundene Tollwutkrankung dar. Die molekularen Unterschiede hinsichtlich Replikation und Wirtsanpassung von Fledermaus- und Nicht-Fledermaus-Lyssaviren und ihre Beteiligung an der Tollwut-Pathogenese sind bisher nicht bekannt. Ein Grund dafür war das Fehlen von reversen genetischen Systemen zur Herstellung von rekombinanten Fledermaus-Lyssaviren. Um die Replikations- und Wirtsadaptationsmechanismen von Fledermaus-Lyssaviren auf molekularer Ebene erforder-

schen zu können, wurde ein entsprechendes System auf der Basis des Europäische Fledermaus Lyssavirus Typ 1 (EBLV-1; Genotyp 5) entwickelt. Dazu wurde das gesamte Virusgenom als cDNA in bakterielle Plasmide kloniert. Durch die Kointransfektion der Virus-cDNA mit Expressionsplasmiden für die Virusproteine N, P und L konnten rekombinante EBLV-1 (rEBLV-1) rekonstituiert werden, deren Replikationseigenschaften mit denen des ursprünglichen EBLV-1 vergleichbar waren. In ersten Analysen wurde untersucht, ob die terminalen Promotoren des EBLV-1 Genotyp-spezifische Funktionen enthalten. Während der Transkription und Replikation vermittelnde Genompromotor nicht gegen entsprechende Sequenzen des Rabies Virus (RABV; Genotyp 1) ausgetauscht werden konnte, zeigten chimäre rEBLV-1 mit Antigenompromotor-Sequenzen des RABV, dass der ausschließlich Replikation vermittelnde Antigenompromotor Genotyp-unspezifisch wirkt und zwischen den Genotypen ausgetauscht werden kann. Das etablierte System zur Herstellung rekombinanter EBLV-1 bildet eine entscheidende Grundlage für die weiterführende Analyse der wirtsabhängigen und unabhängigen Replikationsmechanismen von Lyssaviren.

ORBANZ UND FINKE. 2010. Generation of recombinant European bat lyssavirus type 1 and inter-genotypic compatibility of lyssavirus genotype 1 and 5 antigenome promoters. *Arch Virol* 155:1631-1641.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB

1.2.3 Familie *Paramyxoviridae*

Zur Familie *Paramyxoviridae* gehören behüllte Viren mit einer einzelsträngigen, linearen RNA negativer Polarität. Paramyxoviren sind bei Säugetieren und Vögeln weit verbreitete Erreger wichtiger Erkrankungen wie z. B. der Staupe und der Newcastle-Krankheit (ND)

1.2.3.1 AVULAVIREN

Der typische Vertreter dieser Gattung ist das Virus der Newcastle-Krankheit (NDV), auch als aviäres Paramyxovirus Serotyp 1 (APMV-1) bezeichnet. Die ND ist eine hochkontagiöse Infektionskrankheit des Geflügels, die weltweit vorkommt. Die Empfänglichkeit von Vögeln aus 27 von 50 Ordnungen ist beschrieben, besonders empfänglich gegenüber der Erkrankung sind Hühner und Puten. Zu unterscheiden sind verschiedene Pathotypen. Velo- und mesogene Viren induzieren eine akute systemische Erkrankung und sind anzeigepflichtig. Demgegenüber verlaufen Infektionen mit lentogenen Viren zumeist symptomfrei. Insgesamt sind neun Serotypen (APMV-1 bis -9) der aviären Paramyxoviren beschrieben, wobei der Serotyp 1 bzw. NDV am besten charakterisiert ist.

Untersuchung des Einflusses des Insertionsortes eines Fremdgens innerhalb des NDV Genoms auf die Expression des Fremdproteins

Bei den Paramyxoviren hängt die Expressionsrate der Virusproteine von der Anordnung des entsprechenden Gens im Genom ab, da ein Transkriptionsgradient vom 3'- zum 5'-Ende des Genoms existiert. Entsprechend des NDV Genomaufbaus (3'-NP-P-M-F-HN-L-5') bedeutet das, dass am meisten Nukleoprotein (NP) und am wenigsten RNA-abhängige RNA-Polymerase exprimiert wird. Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsgradient auch für die Expression von Fremdgenen nach Insertion in das NDV-Genom wichtig ist, wurde das Gen für das Hämagglutinin (HA) eines hochpathogenen aviären Influenzavirus (HPAIV) zwischen die Gene P (Phosphoprotein) und M (Matrixprotein), M und F (Fusionsprotein) oder F und HN (Hämagglutinin-Neuraminidase Protein) des lentogenen NDV Clone 30 eingebaut. Die entsprechenden Viren konnten generiert und in spezifisch pathogen-freien embryonierten Hühnereiern vermehrt werden. Die HPAIV HA-spezifische RNA wurde mit Bezug auf die NDV P-RNA durch Northern-Blot Analyse quantifiziert, während die jeweilige Proteinmenge durch Massenspektrometrie ermittelt wurde. Die erhaltenen relativen RNA- und Proteinmengen korrelierten gut. Der Unterschied der Expressionsstärke für die verschiedenen Einbauorte war allerdings gering, wobei die höchste HA Expression, anders als nach dem NDV-Transkriptionsgradienten erwartet, für das Virus nachgewiesen wurde, bei dem das HA Gen zwischen NDV F und HN, also am weitesten vom 3'-Ende entfernt, eingebaut war. Die Expression eines eingebauten Fremdgens verringert sich jedoch, wenn bei gleichem Einbauort die Entfernung zum 3'-Ende durch Einbau weiterer Fremdgene in 3'-Richtung vergrößert wird. Dieser Nachweis erfolgte durch den Einbau des für die HPAIV Neuraminidase (NA) kodierenden Gens zwischen F und HN mit und ohne HA-Einbau zwischen NDV P und M.

RAMP *et al.* 2010. Influence of Insertion Site of Avian Influenza Virus Hemagglutinin (HA) Gene Within the Newcastle Disease Virus Genome on HA Expression. *J Gen Virol* [Epub ahead of print; doi:10.1099/vir.0.027417-0]

1.2.4 Familie *Orthomyxoviridae*

Die Familie *Orthomyxoviridae* umfasst behüllte Viren mit einem segmentierten Genom aus einzelsträngiger RNA negativer Polarität. In die lipidhaltige Virushülle sind 1–3 Glykoproteine und 1–2 nicht-glykosylierte Proteine eingelagert, die 10–14 nm lange und 4–6 nm im Durchmesser große sichtbare „Spikes“ auf der Oberfläche bilden. Die Übertragung findet überwiegend durch Tröpfcheninfektion statt. Dies gilt insbesondere für die Influenzaviren, die bei Säugetieren und Vögeln symptomlose Infektionen oder schwere Erkrankungen hervorrufen können.

1.2.4.1 INFLUENZA A VIREN

Das Genom der Influenza A Viren ist in acht Segmente unterteilt. Charakterisiert werden die Influenza A Viren durch die Glykoproteine Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N), von denen 16 bzw. 9 Subtypen bekannt sind. Die Nomenklatur erfolgt nach dem Muster A/HxNx. Infektionen mit Influenza A Viren besitzen für Mensch und Tier große Bedeutung. Ähnlich wie beim Menschen verlaufen solche Infektionen bei Pferden und Schweinen als fieberhafte Allgemeinerkrankung mit respiratorischer Symptomatik. Beim Geflügel kann es dagegen zu verlustreichen systemischen Infektionen kommen, sofern die Erreger eine hohe Pathogenität besitzen. Hochpathogene Biotypen entstehen durch Mutation aus niedrigpathogenen Vorläufern, die ihr natürliches Reservoir in aquatisch lebenden Wildvogelpopulationen haben. Infektionen mit hochpathogenen aviären Influenzaviren der Subtypen H5 und H7 werden als klassische Geflügelpest bezeichnet. Eine Besonderheit stellen Infektionen mit dem aus Asien stammenden Geflügelpestvirus des Subtyps H5N1 dar. Es kann beim Menschen eine tödlich verlaufende Erkrankung auslösen.

Das 2009 erstmals aufgetretene und sich pandemisch ausbreitende humane Influenzavirus des Subtyps H1N1 (H1N1pdm) bestimmte auch 2010 das Influenzageschehen beim Menschen. Durch den Eintrag in Haus- und Nutztierpopulationen wurden auch offene Fragen für die Veterinärmedizin aufgeworfen. Insbesondere Untersuchungen zur Empfänglichkeit anderer Spezies und die derzeitige Verbreitung von Influenzaviren in den Nutztierbeständen sind von Bedeutung.

DIAGNOSTIK

RT-LAMP, ein feldtaugliches Verfahren zur Diagnostik aviärer Influenzavirusinfektionen?

Gesetzlich vorgegebene Diagnostikalgorithmen und gruppenvalidierte Real-time-RT-PCRs (RTqPCR) bestimmen das Bild der Diagnostik aviärer Influenzavirusinfektionen (AIV) in Europa. RTqPCRs haben sich aufgrund ihrer sehr hohen Sensitivität und Spezifität sowie den Vorteilen in der Vermeidung von Kontaminationen durchgesetzt, sind jedoch an die Verfügbarkeit entsprechender, teurer Geräte gebunden. Daher wurden Untersuchungen zu „on-site“ tauglichen Diagnostikverfahren vorgenommen, die unabhängig von einem großen Gerätepark sind. Zu diesen zählt auch ein isothermes Amplifikationsverfahren von Nukleinsäuren, die LAMP. Die zur Detektion von AIV-Infektionen der Subtypen H5 und H7 kommerziell angebotenen Kits ergaben jedoch in der Validierung ein heterogenes Bild und fielen hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität gegenüber der RTqPCR klar ab. Insbesondere wurden Einschränkungen in der Breite der Reaktivität innerhalb eines Subtyps festgestellt.

POSTEL *et al.* 2010. Evaluation of two commercial loop-mediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes. *J Vet Diagn Invest* 22:61-66.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; Mast Diagnostica Laboratoriums-
präparate GmbH, Reinfeld

EPIDEMIOLOGIE

Phylogenetische Untersuchungen zu Eintrags- und Verbreitungswegen der hochpathogenen aviären Influenza (HPAIV) H5N1 in Europa 2007

Im Jahr 2007 kam es in Europa zu wiederholten Ausbrüchen der HPAI H5N1 bei Wildvögeln und in Hausgeflügelhaltungen. Mit einer ausgedehnten phylogenetischen Analyse der Vollängensequenzen der beteiligten Viren wurde versucht, Eintrags- und Verbreitungswege zu verfolgen. Hierbei wurden auch Bio-Informatikverfahren zur Schätzung der vorherrschenden Wirtsspezies und des geographischen Verbreitungsgebietes einzelner Viruslinien angewendet. Die Daten zeigten einerseits die Überlegenheit von Vollängensequenzen viraler Genome gegenüber einzelnen Genomsegmenten, sofern Reassortierungen ausgeschlossen werden konnten. Andererseits blieben die Schätzungen mit einer hohen Fehlerquote behaftet, da für den beobachteten Zeitraum innerhalb eines vergleichbar kleinen geographischen Raumes nicht genügend Sequenzinformationen verschiedener Virusisolate zur Verfügung standen. Klar ist jedoch, dass es 2007 mehrfach zu Wirtswechseln (Hausgeflügel versus Wildvögel) zwischen zwei parallel zirkulierenden und neu eingetragenen HPAIV-H5N1-Viruslinien kam, deren Ursprungsgebiet nicht exakt ermittelt werden konnte. Das Hauptmanifestationsgebiet der HPAI 2007 in Europa waren Südostdeutschland und die tschechische Republik.

HAASE *et al.* 2010. Possible sources and spreading routes of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 infections in poultry and wild birds in Central Europe in 2007 inferred through likelihood analyses.

Infect Genet Evol 10:1075-1084.

Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald; Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; National Veterinary Research Institute, Pulawy (Polen); Univerza v Ljubljani (Slowenien); Stany Veterinarny Ustav, Zvolen (Slowakei); Sarajevo Veterinary Faculty, Sarajevo (Bosnien und Herzegowina); ANSES, Ploufragan, (Frankreich); University of Oxford (UK)

Situation der endemischen Geflügelpest in Ägypten

Seit dem Ersteintrag des hochpathogenen aviären Influenzavirus des Subtyps H5N1 nach Ägypten im Jahr 2006 zirkuliert das Virus kontinuierlich in den dortigen Hausgeflügelpopulationen. Flächendeckende Impfkampagnen, Keulungsmaßnahmen in infizierten Beständen und generelle Geflügeltransportkontrollen haben sich aufgrund der strukturellen Gegebenheiten der Geflügelhaltung in Ägypten bislang als unzureichend für eine Eradikation erwiesen. Die vielfachen Kontaktmöglichkeiten zwischen in-

fiziertem Geflügel und der Bevölkerung bedingen ein hohes Risiko menschlicher Infektionen (derzeit 120 Fälle, 40 mit tödlichem Verlauf). Phylogenetische Studien zeigten, dass mehrere Viruslinien kozirkulieren, wobei Viren, die aus menschlichen Infektionen stammen, charakteristische Mutationen und eine enge Verwandtschaft zu den bei Wassergeflügel zirkulierenden Stämmen aufwiesen. Daneben wurde eine Viruslinie identifiziert, die als antigene Driftvariante vornehmlich in industriellen Hühnerhaltungen vorkommt. Die genetischen Veränderungen dieser Viruslinie erstrecken sich auch auf Genbereiche, die für die molekulare Diagnostik von Bedeutung sind. Daher wurde eine auf der Real-time-RT-PCR-Technik basierende Multiplex-Methode zur Identifizierung und Differenzierung dieser in Ägypten zirkulierenden Linien entwickelt. Die Studien zur Geflügelpestsituation in Ägypten erfolgten im Rahmen eines OIE-Twinning-Projektes zwischen Deutschland und Ägypten.

ABDELWHAB *et al.* 2010a. Increasing Prevalence of Unique Mutation Patterns in H5N1 Avian Influenza Virus HA and NA Glycoproteins from Human Infections in Egypt. Sequencing 2010:Article ID 450823.

Institut für Geflügelkrankheiten, Freie Universität Berlin; Animal Health Research Institute, Giza (Ägypten); Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, Insel Riems

ABDELWHAB *et al.* 2010b. Simultaneous detection and differentiation by multiplex real time RT-PCR of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 classic (clade 2.2.1 proper) and escape mutant (clade 2.2.1 variant) lineages in Egypt. Virology J 7:260.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; Freie Universität Berlin (beide Deutschland); Animal Health Research Institute, Dokki, Giza (Ägypten)

PATHOGENITÄT:

Aminosäuren in der Nachbarschaft der Hämagglutinin-Spaltstelle sind für die Virulenz hochpathogener aviärer Influenzaviren des Subtyps H5 relevant

Die wichtigste Virulenzdeterminante der hochpathogenen aviären Influenzaviren (HPAIV) ist die polybasische Spaltstelle des Hämagglutinins (HA). Allerdings führt die Einführung einer polybasischen Spaltstelle nicht zur unmittelbaren Umwandlung eines niedrigpathogenen Virus in ein HPAIV, was die Notwendigkeit weiterer Anpassungen nahelegt. In diesem Projekt wurde untersucht, ob die Virulenz der HPAIV im Huhn von den unmittelbar zur HA-Spaltstelle benachbarten Aminosäuren beeinflusst wird. Die meisten HPAIV mit Serotyp H5 haben im HA an der Position 346 (nach H3-Nummerierung Position 323) ein Serin oder Threonin, während nahezu alle niedrigpathogenen H5-Viren an dieser Position ein Valin tragen. Weiterhin haben alle niedrigpathogenen H5-Stämme ein Threonin an Position 351 (nach H3-Nummerierung Position 328), was zur Vermutung führt, dass der Erwerb der polybasischen Spaltstelle in der Evolution zum HPAIV mehrere Schritte umfasst. Daher stellen

wir eine Mutante des HPAIV A/Swan/Germany/R65/06 H5N1 (R65) her, in der die polybasische Spaltstelle in eine monobasische HA-Spaltstelle umgewandelt wurde (R65mono-S-ER). Davon abgeleitet wurden Mutanten mit veränderter Spaltstellenumgebung: R65mono-V-ER, in der Serin an Position 346 durch Valin ersetzt wurde, und R65mono-S-ETR und R65mono-V-ETR, in denen Threonin an Position 351 eingefügt wurde. Darüber hinaus wurde im HA von R65 Serin an Position 346 durch Valin ersetzt (R65-V). Die Infektion von Hühnern mit R65mono-S-ETR oder R65mono-S-ER führte nur zu leichten, vorübergehenden respiratorischen Symptomen, während alle mit R65 infizierten Tiere innerhalb von 2 Tagen verstarben. Jedoch überlebten die Hühner, die mit R65-V infiziert worden waren, etwas länger. Daher trägt wahrscheinlich Serin an Position 346 zur Virulenz bei. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die Evolution von H5 HPAIV aus niedrigpathogenen Vorläufern über den Erwerb einer polybasischen HA-Spaltstelle hinaus die Anpassung der benachbarten Regionen erfordert.

GOHRBANDT *et al.* 2010. Amino acids adjacent to the haemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5. J Gen Virol 92:51-59.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Hochpathogene H5N1 Influenzaviren besitzen Virulenzdeterminanten zusätzlich zur polybasischen Hämagglutinin-Spaltstelle

Hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) stammen von niedrigpathogenen Vorläufern ab und unterscheiden sich von allen anderen Influenzaviren durch eine polybasische Spaltstelle in ihrem Hämagglutinin (HA). HPAIV tragen ausschließlich die HA-Subtypen H5 oder H7. In diesem Projekt untersuchten wir, ob die Insertion einer polybasischen Spaltstelle in einen niedrigpathogenen H5N1-Stamm ausreicht, diesen in ein HPAIV zu transformieren. Mittels reverser Genetik wurde die monobasische Spaltstelle des niedrigpathogenen Stammes A/Teal/Germany/Wv632/2005 (H5N1) (TG05) durch ein polybasisches Motiv von einem HPAIV ersetzt (TG05_{poly}). Um das Virulenzpotential aller Virusgene eines HPAIV herauszuarbeiten, wurden zwei Reassortanten hergestellt: Eine trägt das HA des HPAIV A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) (R65) und die verbleibenden sieben Gene von TG05 (TG05-HA_{R65}) und die zweite Reassortante enthält in umgekehrter Genkonstellation das mutierte TG05-HA und die Gene von R65 (R65-HA_{TG05poly}). *In vitro* können TG05_{poly} sowie die beiden Reassortanten ohne Trypsin replizieren, was für HPAIV charakteristisch ist. Darüber hinaus sind TG05_{poly}, TG05-HA_{R65}, and R65-HA_{TG05poly} in dieser Abfolge zunehmend pathogen für Hühner. Während die HA-Spaltstellenmutante TG05_{poly} zu vorübergehender nicht-letal Erkrankung in allen Tieren führte, führte die Reassortante TG05-HA_{R65} zum Tod von 3 von 10 Tieren. Die höchste Letalität zeigte sich bei der Reassortante R65-HA_{TG05poly} bei der nach Infektion 8 von 10 Tieren starben, was

zirkulierenden HPAIV nahekommst. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der Erwerb der polybasischen HA-Spaltstelle lediglich ein notwendiger Schritt von mehreren in der Evolution von niedrigpathogenen H5N1-Stämmen zu HPAIV ist. Die niedrigpathogenen Stämme scheinen jedoch bereits ein kryptisches Virulenzpotential zu besitzen. Die zusätzlichen Virulenzdeterminanten der H5N1-HPAIV sind offenbar sowohl im HA als auch in den anderen viralen Proteinen lokalisiert.

Boos *et al.* 2010. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses Carry Virulence Determinants beyond the Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site. *PLoS ONE* 5(7):e11826.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Die Infektion des Thymus mit hochpathogenen Influenzaviren beeinträchtigt die T-Zellentwicklung

Hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) verursachen schwerwiegende Krankheitsbilder im Menschen. Jedoch ist der Grund für ihre hohe Pathogenität unklar. Zusätzlich bleibt die erhöhte Erkrankungsrate bei jungen Menschen unerklärlich und auch die letzte Pandemie in 2009 mit dem H1N1-Virus machte deutlich, wie dringend ein besseres Verständnis der Influenzavirusinfektion ist. In der vorliegenden Studie können wir zeigen, dass in Mäusen eine HPAIV-Infektion nicht nur zu einer Zerstörung der Lunge, sondern auch zu einem funktionellen Schaden des Thymus führt. Außerdem fungieren respiratorische Dendritische Zellen der Lunge als Ziel einer HPAIV-Infektion, wobei diese fähig sind, infektiöses Virus von der Lunge in den Thymus zu transportieren. Das pandemische H1N1-Virus ist ebenso fähig, Dendritische Zellen zu infizieren. Jedoch konnte dieses Virus keinen maßgeblichen Transport in den Thymus auslösen. Diese starke Beeinflussung des Immunsystems durch HPAI-Viren ist für den Wirt verheerend und kann zu einer Reduktion von Lymphozyten führen. Von unseren Daten zusammenfassend folgern wir, dass HPAIV den Thymus über DCs erreichen können und so die T-Zellentwicklung beeinträchtigen. Darüber hinaus kann dieser außergewöhnliche Mechanismus nicht nur bei Influenzavirusinfektionen vorkommen, sondern könnte auch ein Grund für die erhöhte Immunevasion bei einigen neu auftretenden Pathogenen sein.

VOGEL *et al.* 2010. Highly Pathogenic Influenza Virus Infection of the Thymus Interferes with T Lymphocyte Development. *J Immunol* 185:4824–4834.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfI; Universitätsklinik Tübingen

PRÄVENTION:

Aviäre Influenzaviren (AIV): Dynamik der Antikörperentwicklung in Stockenten nach Infektion oder Immunisierung mit niedrigpathogenen AIV

Wildenten sind das natürliche Reservoir für niedrigpatho-

gene aviäre Influenzaviren (LPAIV) der meisten Subtypen. Die Infektionen von Wildvögeln mit dem hochpathogenen AIV (HPAIV) vom Subtyp H5N1, die seit 2005 in zahlreichen Ländern Asiens, Europas und Afrikas immer wieder nachgewiesen wurden, führten vielerorts zu einem verstärktem Wildvogelmonitoring mit Konzentration auf wildes Wassergeflügel. Dabei liegt der Untersuchungsschwerpunkt auf dem Nachweis von Virus bzw. Virusgenom. Die Kenntnisse über die immunologischen, insbesondere Antikörper-basierten Reaktionen von Wildenten nach erfolgter LPAIV-Infektion sind jedoch sehr lückenhaft, aber wichtig für das epidemiologische Verständnis von Wildvögeln als potentielle Überträger von Influenzaviren auf andere Spezies. Im Tierexperiment mit Stockenten wurde daher die Dynamik der Antikörperentwicklung natürlich infizierter Tiere sowie naiver Tiere nach Infektion bzw. Immunisierung mit verschiedenen LPAIV untersucht. Um sowohl typ- als auch subtypspezifische Antikörper zu erfassen, wurden dafür ein kompetitiver ELISA (cELISA), ein Westernblot als Bestätigungstest und der Hämagglutinationshemmtest (HAH) eingesetzt. Die Tiere wurden bis zu 15 Monate lang untersucht. Sowohl für die natürliche als auch nach experimenteller Infektion konnte gezeigt werden, dass AIV-Infektionen bei Stockenten zu einer monatelang anhaltenden Antikörperproduktion führen. Im Unterschied zum bisherigen Kenntnisstand, der bei Wildenten von schlechter Antikörperbildung generell und dem Fehlen signifikanter HAH-Antikörper ausging, konnten im Tierexperiment sowohl im cELISA als auch mittels HAH hohe Antikörpertiter über mehrere Monate nachgewiesen werden. In weiterführenden Versuchen wurde gezeigt, wie solche durch LPAIV-Infektionen induzierte Immunität eine nachfolgende Infektion der Stockenten mit H5N1 moduliert.

FEREIDOUNI *et al.* 2010. Dynamics of specific antibody responses induced in mallards after infection by or immunization with low pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Dis* 54:79–85.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IfE

Wirksame Immunisierung gegen hochpathogenes Influenzavirus (HPAIV) vom Subtyp H5N1 mittels in Pflanzen exprimiertem Hämagglutinin

Bisher haben sich gegen Influenzaviren inaktivierte Vollvirus- oder Spaltvakzine als Maßstab der Immunisierung erwiesen. Problematisch ist dabei einerseits die Herstellung in biologischen Systemen (embryoniertes Hühnerei oder permanente Zellkultur) oder andererseits die eingeschränkte Möglichkeit schnell auf geänderte antigene Strukturen zu reagieren. Im Bereich der Veterinärmedizin ist zudem mit den klassischen Vakzinen nur das stark beschränkte Marker-Prinzip des Nachweises von heterotypischen Neuraminidase-Antikörpern nutzbar.

Die Entwicklung neuer Subunitvakzinen auf Basis des Hämagglutinins (HA) ist daher ein wichtiger Forschungszweig. Wir haben in Kooperation mit einem Industriepartner pflanzenexprimiertes Hämagglutinin (HA5) im Hühnermodell auf

seine Wirksamkeit geprüft. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass in einem Pflanzenvirusreplikon-System hergestelltes und nativ gereinigtes HA5 Hühner sehr effizient vor einer Infektion mit dem tödlichen HPAIV H5N1 schützen kann. Der Nachweis von NP-Antikörpern kann dabei als sensitives Markerdiagnostikum genutzt werden.

Das neue System eröffnet damit die Möglichkeit eines alternativen Prozesses der schnellen und flexiblen (Marker) Impfstoffproduktion, das auch bei anderen Subtypen, z. B. dem pandemischen H1N1/2009 angewendet werden kann.

KALTHOFF *et al.* 2010. Immunization with plant-expressed hemagglutinin protects chickens from lethal highly pathogenic avian influenza virus H5N1 challenge infection. *J Virol* 84:12002-12010.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; Bayer Health Care, Monheim; ICONGENETICS, Halle.

Probleme der Impfprävention der hochpathogenen aviären Influenza (HPAI) unter Praxisbedingungen

In einer zweijährigen Feldstudie in einer unter kommerziellen Bedingungen gehaltenen Legehennenherde wurden Impfkonzeppte unter Verwendung einer zugelassenen inaktivierten Vollvirusvakzine (H5N2) untersucht. Die Effektivität der Impfungen wurde serologisch und mittels experimenteller Belastungsinfektionen geprüft. Mindestens zwei Impfungen waren erforderlich, um einen klinischen Schutz zu induzieren. Jedoch konnten auch regelmäßig in halbjährlichen Abständen durchgeführte Auffrischungsimpfungen nicht verhindern, dass sich geimpfte Tiere mit HPAIV H5N1 infizierten und dieses Virus sowohl an geimpfte wie ungeimpfte Kontakttiere übertrugen. Da geimpfte, HPAIV-infizierte Tiere klinisch gesund blieben, muss mit einer „stummen“ Ausbreitung von HPAIV in geimpften Legehennenherden gerechnet werden. Der Einsatz des Impfstoffes war mit erheblichem logistischem Aufwand im Bestand verbunden. Vor einem Einsatz von Vakzinen gegen HPAI sollten Kontrollkonzepte erarbeitet und umgesetzt werden, die eine stumme Virusverbreitung in einer geimpften Geflügelpopulation sicher detektieren, so dass entsprechende Gegenmaßnahmen rechtzeitig ergriffen werden können.

RUDOLF *et al.* 2010. Longitudinal 2 years field study of conventional vaccination against highly pathogenic avian influenza H5N1 in layer hens. *Vaccine* 28:6832-6840.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IMB, Insel Riems; Friedrich-Loeffler-Institut, IfE, Wusterhausen; Geflügelveterinärpraxis, Delbrück

PANDEMISCHES INFLUENZAVIRUS

Influenzainfektionen bei Säugetieren

Das 2009 erstmals aufgetretene und sich pandemisch ausbreitende humane Influenzavirus des Subtyps H1N1 (H1N1pdm) bestimmte auch 2010 das Influenzageschehen beim Menschen. Mit zunehmender Inzidenz menschlicher

Infektionen zeigte sich, dass auch diverse Tierarten für natürliche Infektionen mit diesem Virus empfänglich sind (Schweine, Puten, Katzen, Frettchen, Nerz, Hund), wobei der Mensch jeweils als Überträger des Virus fungierte. Da insbesondere Schweine auch stabile Infektionsketten untereinander aufbauen können, ist mit einem größeren Einbruch und weiterer Verbreitung von H1N1pdm in der Schweinepopulation zu rechnen. Zur Anpassung der diagnostischen Möglichkeiten wurden daher Real-time-RT-PCRs zur Untersuchung von porzinen Proben entwickelt. Katzen sind auch gegenüber weiteren Influenzavirussubtypen empfänglich, wobei in der Vergangenheit Infektionen mit dem hochpathogenen aviären Influenzavirus H5N1 tödlich verliefen. In experimentellen Infektionen konnte gezeigt werden, dass bei Katzen auch der Magen-Darmtrakt als Eintrittspforte der Infektionen fungieren kann.

HOFFMANN *et al.* 2010. New real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions facilitate detection and differentiation of novel A/H1N1 influenza virus in porcine and human samples. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 123:286-292.

STECH *et al.* 2010. The pandemic influenza virus H1N1/2009: a review of the molecular biology, phylogeny, history of reassortments, and parameters of host switching. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitschutz* 53:1231-1237.

VAHLENKAMP *et al.* 2010. Systemic influenza virus H5N1 infection in cats after gastrointestinal exposure. *Influenza Other Respi Viruses* 4:379-386.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IMB; Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart

Pandemisches Influenzavirus H1N1/2009: Infektionsexperimente mit Hühnern, Puten und Mäusen

Das Auftreten des neuen pandemischen Influenza A Virus H1N1/2009 beim Menschen und auch beim Schwein hat offene Fragen bezüglich der Empfänglichkeit anderer Spezies aufgeworfen. Daher wurden in einem Tierexperiment Puten, Hühner und Mäuse mit verschiedenen H1N1/2009-Isolaten inokuliert und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Hühner keinerlei Empfänglichkeit zeigen (keine Replikation, keine Serokonversion), während Puten bei hoher Dosis minimale Virusreplikation ermöglichten. Bei den inokulierten Puten wurde zudem eine geringgradige Serokonversion beobachtet. Bei Puten ist daher grundsätzlich von der Möglichkeit der Adaptierung des neuen H1N1-Stammes auszugehen.

Die oronasale Infektion von Mäusen führte zu keiner ausgeprägten Klinik, aber zur gut nachweisbaren Serokonversion. Die Virulenz für Mäuse ist insgesamt als gering zu beurteilen.

KALTHOFF *et al.* 2010. Limited Susceptibility of Chickens, Turkeys, and Mice to Pandemic (H1N1) 2009 Virus. *Emerg Infect Dis* 16:703-705.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IMB

1.2.5 Familie *Bunyaviridae*

Die Familie *Bunyaviridae* beinhaltet fünf Gattungen. Zu den Gattungen *Hantavirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* und *Phlebovirus* gehören neben ausschließlich tierpathogenen Erregern auch Zoonose-Erreger, wie beispielsweise Hantaviren, Krim-Kongo-Hämorrhagisches Fieber-Virus und das Rift Valley Fever-Virus. Ein weiteres Genus, *Tospovirus*, beinhaltet ausschließlich pflanzenpathogene Viren. Außer bei Hantaviren erfolgt die Übertragung der Bunyaviren auf Mensch und Haustiere durch Arthropoden, wie Mücken und Zecken.

Bunyaviren sind behüllte Viren mit einem segmentierten Negativstrang-RNA-Genom. Die Genomsegmente werden nach ihrer Größe als S- (small), M- (medium) und L- (large) Segment bezeichnet. Die Strukturproteine werden von zwei Segmenten kodiert, das Nukleokapsidprotein vom S-Segment und die Hüllproteine vom M-Segment. Das L-Segment kodiert für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Bei einigen Gattungen der Bunyaviren wurden zusätzlich überlappende Leserahmen auf S- und M-Segment beschrieben.

1.2.5.1 HANTAVIREN

Hantavirus-Infektionen können beim Menschen zwei unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen, das Hämorrhagische Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) und das Hantavirale kardiopulmonale Syndrom. Bei Infektionen mit den amerikanischen Hantaviren Sin Nombre-Virus (SNV) und Andesvirus (ANDV) wird eine Letalität von bis zu 40 % beobachtet. In Europa und Asien liegt die Letalität, in Abhängigkeit von der Hantavirus-Spezies, bei 0,1 bis ca. 12 %.

Das natürliche Reservoir für Hantaviren sind wildlebende persistent infizierte Nagetiere. Daneben sind in den vergangenen Jahren neuartige Hantaviren bei Spitzmäusen und Maulwürfen gefunden worden, über deren Humanpathogenität jedoch bisher nichts bekannt ist. In der Regel ist eine Hantavirus-Art immer eng mit einer Reservoirtierart oder sehr nahe verwandten Arten der gleichen Gattung assoziiert.

Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“: Hantavirus-Studien

Aufgrund der begrenzten Kenntnisse zur geografischen Verbreitung und Häufigkeit von Hantavirus-Infektionen in den Nagetier-Reservoirs und deren Schwankungen wurde in Deutschland das Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“ etabliert. Das Ziel des Netzwerkes ist der Aufbau einer Plattform für interdisziplinäre Untersuchungen zur Nagetier-Populationsdynamik, Prävalenz und Evolution von Hantaviren und anderen Nagetier-assoziierten Zoonoseerregern und den zugrunde liegenden Mechanismen sowie deren Auswirkungen auf die Häufigkeit humaner Infektionen.

In enger Kooperation mit Forschungs- und Untersuchungseinrichtungen wurde mit dem Aufbau eines Monitorings von Hantaviren in Nagetieren begonnen. Diese Untersuchungen konzentrieren sich auf bekannte Endemiegebiete, wie Baden-Württemberg, Bayern, Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen, und auf Regionen mit einer bisher geringen Zahl humaner Fälle, wie Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Schleswig-Holstein und Hessen.

Im Rahmen der Untersuchungen zu den potentiellen Reservoirwirten von Hantaviren wurden 469 Feldmäuse (*Microtus arvalis*) und 322 Erdmäuse (*Microtus agrestis*) auf das Vorliegen von TULV-Infektionen untersucht. Basierend auf serologischen und RT-PCR-Untersuchungen mit anschließenden Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass das TULV in Deutschland nicht nur in Feldmäusen, sondern auch in Erdmäusen vorkommt. An einem Fangort wurde sogar ausschließlich TULV in der Erdmaus nachgewiesen, was, unabhängig vom Vorliegen von Spillover-Infektionen, auf einen separaten Transmissionszyklus des Virus in dieser Art hindeutet. Die phylogenetischen Analysen belegen eine geografische Clusterung der TULV-Sequenzen, unabhängig von der Wirtsspezies. Die neuen TULV-Linien aus Nordost-, Nordwest- und Südostdeutschland sind klar voneinander und von anderen Linien aus Deutschland, Europa und Asien getrennt. Die Ergebnisse belegen, dass es sich beim TULV um ein promiskuitives Virus mit einer größeren Zahl suszeptibler Wirte handelt. Außerdem deuten die Ergebnisse auf einen alternativen Evolutionsmechanismus des TULV in *Microtus*-Wirten hin, der sich von einer strengen Virus-Wirt-Koevolution unterscheidet. In weiteren Untersuchungen an sympatrisch vorkommenden TULV-suszeptiblen Reservoirwirtarten soll diese Arbeitshypothese zukünftig geprüft werden.

Im Rahmen der Untersuchungen des Netzwerkes konnten in wildlebenden Nagetieren auch *Escherichia coli* mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen nachgewiesen werden. Des Weiteren liegen erste Daten zum Vorkommen von Infektionen mit Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, Kuhpockenvirus und Leptospiren bei Kleinsäugetieren vor.

FABER *et al.* 2010. Steep rise in notified hantavirus infections in Germany, April 2010. *Eurosurveillance* 15(20).

SCHMIDT-CHANASIT *et al.* 2010. Extensive Host Sharing of Central European Tula Virus. *J Virol* 84:459-474.

GUENTHER *et al.* 2010. Detection of pandemic B2-025-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum β -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J Antimicrob Chemother* 65:582-584.

GUENTHER *et al.* 2010. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Sci Total Environ* 408:3519-3522.

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg; Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München; Friedrich-Loeffler-Institut, IfE und INNT; Landesforstanstalt Eberswalde; Freie Universität Berlin; Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin (alle Deutschland); Institute of Biotechnology, Vilnius (Litauen); Hokkaido University, Sapporo (Japan); University of South Florida,

Tampa, Florida (USA); Universität Bern; Schweizerisches Institut für Bioinformatik, Lausanne (beide Schweiz);

Gefährdung von nicht-humanen Primaten in Freigehegen in Hantavirus-Endemiegebieten

Um das mögliche Risiko natürlicher Hantavirusinfektionen von nichthumanen Primaten zu prüfen, wurden von uns Serumproben von drei Primatenarten aus Freilandgehegen des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) in Göttingen, das sich in einem Hantavirus-Endemiegebiet befindet, untersucht. Dafür wurden serologische Assays auf der Basis von rekombinanten Antigenen des PUUV und des TULV verwendet, deren Reservoirwirte Rötelmaus und Feld- und Erdmaus deutschlandweit verbreitet sind. In 24 der 251 (9,6 %) untersuchten Affenseren konnten PUUV- und/oder TULV-reaktive Immunglobulin G (IgG)-Antikörper nachgewiesen werden. Die Untersuchung von Folgeseren von 13 Tieren bestätigte für zwei Tiere eine Serokonversion durch eine Hantavirusexposition am DPZ. Um den Ursprung der Infektionen aufzuklären, wurden wildlebende Nagetiere aus der Umgebung des DPZ mittels Hantavirus-spezifischer RT-PCR untersucht. In 6 von 73 untersuchten Rötelmäusen und in 3 von 19 untersuchten *Microtus*-Mäusen wurden PUUV- und TULV-spezifische Nukleinsäuresequenzen nachgewiesen. Der Nachweis natürlicher Hantavirusinfektionen bei nichthumanen Primaten in Freilandgehegen unterstreicht die Notwendigkeit einer Hantavirusüberwachung und einer entsprechenden Bekämpfung von Wildnagetieren, insbesondere in Hantavirus-Endemiegebieten.

MERTENS *et al.* 2010. Non-human primates in outdoor enclosures: Risk for infection with rodent-borne hantaviruses. *Vet Microbiol* (Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.018)

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT; Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München; Universitätsklinikum Charité, Berlin; Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; Deutsches Primatenzentrum (DPZ), Göttingen (alle Deutschland)

1.2.6 Familie *Picornaviridae*

Zur Familie *Picornaviridae* gehören unbehüllte Viren mit einem einzelsträngigen, linearen RNA-Genom positiver Polarität. Die Viren dieser Familie gehören mit einer Größe von 22 - 30 nm zu den kleinsten Viren. Picornaviren kommen bei einer Vielzahl von Wirbeltieren vor. Wichtige Picornaviren bei Tieren sind das Maul- und Klauenseuche-Virus (MKS) und das Virus der vesikulären Schweinekrankheit (Swine vesicular disease virus, SVDV).

1.2.6.1 APHTHOVIREN

Zu dieser Gattung zählt das Virus der **Maul- und Klauenseuche (MKS)**. Diese fieberhafte Allgemeinerkrankung der Klautiere kommt noch in vielen außereuropäischen

Ländern, insbesondere in der Türkei sowie in Teilen Asiens, Afrikas und Südamerikas vor. Die MKS führt zur Bildung von Bläschen (Aphthen) und Erosionen an kutanen Schleimhäuten und unbehaarten Teilen der Haut, insbesondere im Bereich des Maules und der Klauen. Sie verläuft bei erwachsenen Tieren meist nicht letal, führt aber bei Rindern zu einem lang anhaltenden Leistungsabfall. Bei Jungtieren können hohe Verluste durch Schädigung des Herzmuskels auftreten. Die MKS gehört wegen ihrer potentiell katastrophalen Auswirkungen auch heute noch zu den wirtschaftlich bedeutendsten Tierseuchen. Ihre besondere Bedeutung beruht auf ihrer hohen Kontagiosität sowie auf den wirtschaftlichen Verlusten infolge der zu ihrer Bekämpfung erforderlichen drastischen Sperr- und Kontrollmaßnahmen.

Diagnostik und Prävention der MKS

Zur sicheren Diagnose der MKS ist die kontinuierliche Weiterentwicklung der Diagnostik-Methoden erforderlich. Auch neu auftretende MKS-Stämme müssen durch die Diagnostik (Zellkultur, PCR und Serologie) sicher und sensitiv erkannt werden. Hierzu werden insbesondere die etablierten Real-time-PCR-Systeme ständig weiter optimiert und validiert, u. a. durch Modifikationen an Primern und Sonden.

Effektive Impfstoffe sind zur Bekämpfung der MKS in akuten Ausbruchssituationen und zur Eingrenzung der wirtschaftlichen Schäden von großer Bedeutung. Im Rahmen des EU-finanzierten Projektes FMD-DISCONVAC wird insbesondere für Isolate des Serotyps A untersucht, ob die in der deutschen oder europäischen Vakzinebank vorhandenen Impfstoffe einen ausreichenden Schutz vermitteln. Hierbei kommen zum einen *In-vitro*-Verfahren, insbesondere die r-Wert-Bestimmung im Neutralisationstest, und zum anderen der Rinderchallenge-Test nach der Europäischen Pharmakopöe zum Einsatz. Außerdem wird im Rahmen dieses Projektes an der internationalen Vereinheitlichung der eingesetzten Verfahren mitgearbeitet.

SAMMIN *et al.* 2010. Options for decentralized testing of suspected secondary outbreaks of foot-and-mouth disease. *Transbound Emerg Dis* 57:237-43

UTTENTHAL *et al.* 2010. Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. *Expert Rev Vaccines* 9:73-87.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; Central Veterinary Research Laboratory, Celbridge (Irland); Institut for Animal Health, Pirbright (UK); AFSSA, Maisons Alfort (Frankreich); Kimron Veterinary Institute, Beit-Dagan (Israel); National Centre for Foreign Animal Diseases, Winnipeg (Canada); EUFMD Sekretariat, FAO, Rome; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (Italien); Technical University of Denmark, Lindholm (Dänemark)

1.2.7 Familie *Hepeviridae*

Die Familie der *Hepeviridae* umfasst unbehüllte Viren mit einem einzelsträngigen, linearen RNA mit positiver Polarität.

Das humanpathogene Hepatitis-E-Virus (HEV) ist der typische Vertreter der einzigen Gattung Hepeviren dieser Familie und wird in 4 Genotypen eingeordnet. Die Genotypen 3-4 kommen sowohl in Tieren (vor allem in Haus- und Wildschweinen) als auch in Menschen vor und verdeutlichen das zoonotische Potential des Virus. Früher wurden diese Viren als Hepatitis E-like Virus der Familie der *Caliciviridae* zugeordnet.

1.2.7.1 HEPATITIS E-VIRUS

Prävalenzstudien zum Hepatitis E-Virus in Hausschweinen

Unter Verwendung verschiedener serologischer Testverfahren wurden insgesamt 1072 Seren von Hausschweinen aus Deutschland auf das Vorliegen HEV-spezifischer Antikörper untersucht. Obwohl die Studie insgesamt eine starke Seroprävalenz für die Schweine gezeigt hat, zeigten die deutlichen Unterschiede in den Prävalenzen, die bei Verwendung der verschiedenen Tests erhalten wurden, die Notwendigkeit der Entwicklung und Validierung neuer serologischer Testverfahren und deren Standardisierung für vergleichende seroepidemiologische und Longitudinalstudien. Zu diesem Zweck ist mit der Herstellung rekombinanter Antigene eines in Deutschland bei Wildschweinen gefundenen Genotyp 3-HEV begonnen worden.

BAECHLEIN *et al.* 2010. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbiol* 144:187-191.

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin; Friedrich-Loeffler-Institut, INNT

Hepatitis E-Virus in Ratten

Die im Rahmen des Netzwerkes „Nagetier-übertragene Pathogene“ gesammelten Kleinsäugerproben führten auch zur Identifikation eines neuartigen Hepatitis E-Virus (HEV)-ähnlichen Agens bei der Wanderratte (*Rattus norvegicus*). Zunächst wurden in 2 von 30 Kotproben von Wanderratten aus Hamburg HEV-ähnliche Nukleinsäuresequenzen nachgewiesen. Sequenzvergleiche der Genomsegmente von 4019 und 1545 Nukleotiden Länge mit denen von humanen und aviären HEV-Stämmen zeigten eine Sequenzidentität von nur 59,9 und 49,9 %. Die Sequenzidentität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen vom Kapsidprotein betragen ebenfalls nur 56,2 und 42,9 %. Im Weiteren konnten die kompletten Nukleotidsequenzen der Genome dieses Virus aus Leberproben von 2 weiteren Wanderratten aus Hamburg analysiert werden. Die phylogenetischen Analysen der Kompletengenomsequenzen wie auch partieller Nukleotid- und abgeleiteter Aminosäuresequenzen bestätigten die klare Abtrennung dieses neuen HEV-Genotyps aus der Wanderratte von den humanpathogenen Genotypen 1-4 und dem aviären Genotyp. Quantitative RT-PCR-Analysen und

immunhistochemische Analysen belegten den Lebertropismus dieses Virus. Weiterführende Untersuchungen sollen zukünftig zeigen, in wie weit dieses Virus ein zoonotisches Potential besitzt und somit eine Gefährdung für den Menschen darstellt.

JOHNE *et al.* 2010. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 91:750-758.

JOHNE *et al.* 2010. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg Infect Dis* 16:1452-1455.

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin; Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg; Friedrich-Loeffler-Institut, ATB und INNT; Freie Universität Berlin (alle Deutschland); Universität Bern, Schweizerisches Institut für Bioinformatik, Lausanne (beide Schweiz); Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich

1.2.8 Familie *Flaviviridae*

Zur Familie *Flaviviridae* gehören umhüllte Viren mit einem linearen einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität. Die Familie wird in die Genera *Flavivirus* (Typvirus Gelbfiebervirus), *Pestivirus* (Typvirus Erreger der klassischen Schweinepest) sowie *Hepacivirus* (Erreger der Hepatitis C) unterteilt.

1.2.8.1 PESTIVIREN

Zur Gattung *Pestivirus* gehören die tierpathogenen Erreger der klassischen Schweinepest (KSP), der bovinen Virusdiarrhoe/mucosal disease (BVD/MD) und der Border disease (BD).

Molekulare Epidemiologie europäischer Virusisolate der Klassischen Schweinepest

Die Klassische Schweinepest (KSP) gehört zu den wichtigsten Tierseuchen weltweit. Ausbrüche dieser anzeigepflichtigen Tierseuche haben in den letzten Jahrzehnten auch in Europa immense Verluste verursacht. Die KSP wird durch ein RNA-Virus des Genus *Pestivirus* verursacht, das unter natürlichen Bedingungen ausschließlich Haus- und Wildschweine infiziert. Auf der Grundlage von Sequenzvergleichen lassen sich die auftretenden Virusstämme in drei Genotypen einteilen, wobei der Genotyp 2 der momentan vorherrschende ist. Insbesondere treten in Europa Stämme des Subtyps 2.3 auf.

Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen wurden Virusstämme aus Deutschland und Südosteuropa mittels traditioneller und neu etablierter molekularbiologischer Methoden untersucht. Auf der Basis der erhobenen Daten konnten epidemiologische Zusammenhänge und Aspekte der Virusevolution detailliert betrachtet werden. Insbesondere konnten zum ersten Mal datenbasierte Hinweise ge-

sammelt werden, dass es trotz oraler Immunisierung zu einer Langzeitpersistenz der vorherrschenden KSPV-Stämme in Wildschweinepestgebieten kommen kann.

BLOME *et al.* 2010. Classical swine fever virus in South-Eastern Europe--retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology. *Vet Microbiol* 146:276-284.

Leifer *et al.* 2010. Molecular epidemiology of current classical swine fever virus isolates of wild boar in Germany. *J Gen Virol* 91:2687-2697.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IfE

Genetic-DIVA bei Schweinepest: Optimierung der C-Stamm-spezifischen real-time PCR

Bei Ausbrüchen von Schweinepest in Wildschweinepopulationen, wie beispielsweise 2009 in Deutschland, wird als unterstützende Maßnahme der Bekämpfung die orale Immunisierung mit dem C-Stamm durchgeführt. Die neuen, sehr sensitiven real-time RT-PCR Protokolle führen dabei immer wieder zu Nachweisen von Impfvirus-RNA, insbesondere in den ersten 14 Tagen nach der Impfköder-Auslage. Daher wurde zunächst eine C-Stamm-spezifische real-time RT-PCR entwickelt, die in einem Duplex-System die genetische Differenzierung von Impfvirus und Feldviren zulässt. Dabei zeigten sich jedoch in seltenen Fällen falsch negative Impfvirusnachweise, die auf eine Mutation im E^{RMS}-kodierenden Bereich des C-Stammes Riems zurückgeführt werden konnten. Aufgrund dieser im Impfstoff vorkommenden Variante wurde die differenzierende PCR modifiziert, wobei die neue Version nur noch zwischen Genotyp 1.1 (alle Impfstämme, aber auch Feldviren in Asien) und anderen Genotypen zu differenzieren vermag. Das neue System hat sich als multiplex PCR in Kombination mit interner Kontrolle und pan-KSP-PCR im Feldeinsatz bewährt und alle KSP-Nachweise 2010 konnten in sehr kurzer Zeit als C-Stamm-Detektion klassifiziert werden.

LEIFER *et al.* 2010. Escape of classical swine fever C-strain vaccine virus from detection by C-strain specific real-time RT-PCR caused by a point mutation in the primer-binding site. *J Virol Meth* 166:98-100.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; VLA Weybridge (UK)

Charakterisierung eines neuen, chimären KSP-Marker-Vakzine-Kandidaten mit einem mutierten E2-Epitop

Die Klassische Schweinepest (KSP) gehört weltweit zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten von Schweinen. Für die Unterscheidung von infizierten und geimpften Tieren wurde ein neues chimäres Pestivirus konstruiert. Dazu wurden in einem bovinen Virusdiarrhoe-Virus die Hüllproteine E1 und E2 durch die eines KSP-Virus ausgetauscht. Für eine E2-basierte Marker-Diagnostik wurde außerdem ein antigenes KSP-spezifisches Epitop durch das entsprechende Epitop von BVDV ersetzt. In einem Tierversuch konnte gezeigt werden, dass alle vakzinierten Tiere serokonvertierten, neutralisierende Antikörper bildeten und vor einer Infekti-

on mit dem hochvirulenten KSPV-Isolat Koslov geschützt waren. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (kommerzielle C-Stamm Vakzine) konnten am Tag der Belastungsinfektion deutlich reduzierte E2-spezifische Reaktivitäten im ELISA ermittelt werden. Da aber diese Reaktivitäten ebenso wie die Höhe der Neutralisationstiter von der Vakzinedosis abhängig waren, war eine eindeutige E2-Markerdiagnostik nur bei einer niedrigen Vakzinedosis möglich. In zukünftigen Arbeiten soll die Strategie der Vollängen-Genom-Amplifikation für die Generierung modifizierter Pestiviren weiter genutzt werden, um neue Strategien der Markervakzine-Entwicklung umzusetzen.

REIMANN *et al.* 2010. Characterization of a new chimeric marker vaccine candidate with a mutated antigenic E2-epitope. *Vet Microbiol* 142:45-50.

RASMUSSEN *et al.* 2010. Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy. *Vet Microbiol* 142:13-17.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD und IMED; DTU Nationales Veterinärinstitut, Lindholm (Dänemark)

Identifizierung und Charakterisierung einer neuartigen Signalpeptidasespaltstelle am Carboxyterminus des Glykoproteins E^{RMS} des Virus der klassischen Schweinepest

Pestiviren haben einzigartige Strategien entwickelt, die es ihnen erlauben, langfristig in ihrer Wirtspopulation zu persistieren. Für diese Strategien sind virale Faktoren essentiell, die in das Immunsystem des Wirtstieres eingreifen und so eine schnelle Elimination des Erregers verhindern. Zu diesen Faktoren zählt das E^{RMS}, ein Glykoprotein des Virus, das neben seiner Funktion als Strukturprotein auch eine RNase-Aktivität aufweist, die für die Erregervirulenz und -persistenz entscheidend ist. Der Membrananker des E^{RMS} reicht nicht wie bei den meisten Oberflächenproteinen durch die Membran hindurch, sondern lagert sich planar an die Membranoberfläche an. Diese ungewöhnliche Art der Membranbindung ist vermutlich die Voraussetzung dafür, dass ein Teil des in infizierten Zellen gebildeten E^{RMS} sekretiert wird. Die Proteine von Pestiviren werden in Form eines langen Polyproteins synthetisiert, aus dem Proteasen die reifen Virusproteine ausschneiden. Für die Spaltungen in dem Bereich des Polyproteins, der die viralen Strukturproteine enthält, rekrutieren umhüllte RNA Viren meist die zelluläre Signalpeptidase. Die Art der Membranbindung des E^{RMS} bedingt aber, dass die Spaltstelle zwischen E^{RMS} und dem nachfolgenden E1 dem bekannten Schema einer Signalpeptidasespaltstelle nicht entspricht, das in bisher allen beschriebenen Fällen eine Membran-durchspannende Sequenz enthält. Daraus ergab sich die Frage, welche Protease das Polyprotein zwischen E^{RMS} und E1 spaltet. In aufwändigen Inhibitor- und Mutagenesestudien konnten wir zeigen, dass auch diese Spaltung von der zellulären Signalpeptidase durchgeführt wird. Aufgrund der ungewöhnlichen Mem-

brantopologie der zu prozessierenden Sequenz ist die fragile Spaltung sehr anfällig gegenüber strukturellen Änderungen, so dass auch Mutationen in weit von der Spaltstelle entfernten Sequenzen die Prozessierung unterbinden können. Die E^{ns}/E1 Spaltstelle stellt damit die ungewöhnlichste bisher beschriebene Spaltstelle für diese Protease dar. Die Trennung von E^{ns} und E1 tritt gegenüber den benachbarten Prozessierungsereignissen verzögert auf, so dass ein E^{ns}/E1 Vorläuferprotein in infizierten Zellen detektiert werden kann. Die biologische Bedeutung dieses Befundes ist ein Schwerpunkt weiterer Arbeiten.

BINTINTAN, I. UND G. MEYERS. 2010. A New Type of Signal Peptidase Cleavage Site Identified in an RNA Virus Polyprotein. *J Biol Chem* 285:8572-8584.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfI

1.2.8.2 FLAVIVIREN

Die Gattung Flavivirus umfasst innerhalb der Familie der *Flaviviridae* eine Gruppe von humanpathogenen Viren, die durch Arthropoden übertragen werden. Flaviviren bilden sphärische Kapside mit zwei Membranproteinen (M- und E-protein). Das RNA-Genom liegt in einer Größe von 9-11 kbp in positiver Polarität vor. Einige dieser zoonotischen Erreger, die Enzephalitiden und hämorrhagische Fieber auslösen können, sind auch in Europa verbreitet, darunter das Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus. In mehreren europäischen Ländern konnte auch das West-Nil-Virus nachgewiesen werden.

West-Nil-Virus (WNV)

In einem natürlichen Vermehrungszyklus wird das Virus zwischen lokalen Vogel- und Stechmückenpopulationen übertragen, wobei infizierte Vögel das eigentliche Virusreservoir darstellen. Es wird angenommen, dass das Virus durch Zugvögel über weite Strecken transportiert und so aus Endemiegebieten in andere Gebiete eingeschleppt werden kann. Auf diese Weise kann ein möglicher Viruseintritt auch in unser Land erfolgen.

Da bisher nur wenige Daten zur Untersuchung der WNV-Situation in Deutschland vorliegen, wurde ein dreijähriges Forschungsprojekt zur Antikörper- und Virusprävalenz am INNT durchgeführt. Hierzu wurden mehr als 2700 Blutproben von Zug- und Standvögeln aus 72 verschiedenen Spezies gesammelt und serologisch mit Hilfe von Immunfluoreszenz sowie Neutralisationstest untersucht. WNV-spezifische Antikörper konnten nur bei Zugvögeln (in 11 Spezies) nachgewiesen werden, bei den Standvögeln gelang kein Nachweis. Die durchgeführte qRT-PCR ergab keinen spezifischen Virusgenomnachweis. Aufgrund dieser Ergebnisse ist derzeit kein Vorkommen von WNV für Deutschland nachweisbar.

Dieser Befund wird auch durch die Untersuchung von Sentinelproben erhärtet. Hierfür konnten Stockenten aus 3 natio-

naln Sentinelanlagen untersucht werden, die ursprünglich für Untersuchungen zu aviärer Influenza ausgewählt worden waren. Die durchgeführten Langzeituntersuchungen erstreckten sich auf einen Zeitraum von bis zu 2 Jahren. Alle untersuchten 415 Proben von diesen Sentineltieren waren serologisch und virologisch negativ für WNV.

Weiterhin wurden zwei qualitative real-time RT-PCR Assays entwickelt, die zwei unterschiedliche Regionen innerhalb des WNV-Genoms detektieren können. Beide PCR-Verfahren sind in der Lage, sehr spezifisch und sensitiv WNV der Linie 1 und 2 nachzuweisen. Zusätzlich wurde eine spezifisch modifizierte synthetische RNA-Kontrolle als positive Kontrolle verwendet, mit der die Kopienzahl der viralen RNA ermittelt werden kann.

SEIDOWSKI *et al.* 2010. West Nile virus monitoring of migratory and resident birds in Germany. *Vector Borne Zoon Dis* 10:639-47

Ziegler *et al.* 2010. Sentinel birds in wild-bird resting sites as potential indicators for West Nile virus infections in Germany. *Arch Virol* 155:965-9

EIDEN *et al.* 2010. Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *J Vet Diagn Invest* 22:748-753

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT, Insel Riems; Friedrich-Loeffler-Institut, IVD Insel Riems; Friedrich-Loeffler-Institut, IfE, Wusterhausen; Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie, Plön; Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, FU Berlin; Institut für Vogelforschung, Vogelwarte Helgoland, Inselstation, Wilhelmshaven; Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam; Robert-Koch-Institut, Zentrum für Biologische Sicherheit 1 (alle Deutschland); Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Universität Wien (Österreich)

1.2.8.3 DURCH ZECKEN ÜBERTRAGENE KRANKHEITEN

In Deutschland ist die wichtigste durch Zecken übertragene Viruserkrankung die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und die wichtigste bakterielle Erkrankung die Lyme Borreliose (LB). Weitere durch Zecken übertragene Erkrankungen sind z. B. Babesiose, Anaplasmosis und Rickettsiose, deren Bedeutung zwar zunimmt, insgesamt aber nach wie vor gering ist. FSME und LB sind bedeutende menschliche Erkrankungen. Darüber hinaus ist bei Hunden und Pferden eine Erkrankung an FSME möglich. Ein erster klinischer Fall beim Affen ist von uns im Jahre 2006 beschrieben worden. Klinische Erkrankungen durch *Borrelia burgdorferi* s. l. als Erreger der LB treten bei Pferden, Rindern und Hunden auf. Die Bedeutung der LB bei Schafen, Ziegen und Katzen ist bisher unklar. Vögel können als Reservoirwirte für *Borrelia burgdorferi* dienen, klinische Erkrankungen wurden bisher nicht nachgewiesen.

FSME – Kein Anlass zur Entwarnung

Das Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSMEV) ruft mit der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) die

wichtigste virale durch Zecken übertragene Erkrankung des Menschen in Europa und einigen Ländern Asiens hervor. Auch bestimmte Tierarten (Hund, Pferd, Affe) können an FSME erkranken. Der aktuellen Datenlage zufolge haben sich Lokalisation und Ausdehnung endemischer FSME-Areale in den letzten Jahren im vermuteten Zusammenhang mit der Klimaerwärmung und der Ausbreitung der Zecken in höher gelegene Gebiete geändert. Die gesteigerte Mobilität der Menschen verstärkt die Exposition weiter. Auf lange Sicht kann nur eine hohe Durchimpfungsrate niedrige Krankheitsraten sicherstellen. Die Information der Öffentlichkeit ist die einzige Maßnahme, mit der ein entsprechendes Bewusstsein geschaffen und dieses Ziel umgesetzt werden kann.

Süss, J. 2010. FSME – kein Anlass zur Entwarnung. JATROS Infektiologie 1:28-30.

Süss *et al.* 2010. Tick-borne encephalitis in the age of general mobility. Wien Med Wochenschr 160:94-100.

Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ; FU, Berlin; LGA Baden Württemberg, Stuttgart; Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München; Insect Services, Berlin (alle Deutschland), Medizinische Universität Wien (Österreich); Universität Helsinki (Finnland); Reiskliniken, Oslo (Norwegen); Centre for Communicable Diseases Prevention and Control, Vilnius (Litauen); BAG Bern (Schweiz); Health Protection Agency, London (UK); Health Protection Inspectorat, Tallinn (Estland)

Klimawandel, Zecken und durch Zecken übertragene Krankheiten, unter besonderer Berücksichtigung europäischer Verhältnisse, bei *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus* und Frühsummer-Meningoenzephalitis (FSME)

Klimaveränderungen und die Biologie und Ökologie von Zecken und damit auch die Verbreitung und die Inzidenz von durch Zecken übertragenen Krankheiten stehen naturgemäß in einem sehr engen Verhältnis. Die Qualität und Quantität dieser hoch komplexen Vorgänge mit ihren vielfältigen Interaktionen sind weitgehend unbekannt, obwohl viele konkrete Einzelbeispiele diese Zusammenhänge widerspiegeln. Nordausbreitung von Zeckenbiotopen in Europa, das Vordringen von Zecken in größere Höhen in den Gebirgen, begleitet von der Entwicklung von Naturherden dieser zoonotischen Erkrankungen in bisher erregerfreien Zonen, sind sichtbare und fassbare Beispiele für solche Entwicklungen. Da direkte und indirekte anthropogene Einflüsse dieses Geschehen erheblich triggern, ist viel Forschungsbedarf notwendig, um die Zusammenhänge soweit zu erkennen, dass Konzepte zur Zurückdrängung der durch Zecken übertragenen Erkrankungen auf wissenschaftlicher Basis entwickelt werden können.

Süss, J. 2010. Climate change, ticks and tick-borne diseases with special emphasis on Europe, *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus* and tick-borne Encephalitis (TBS). Nova Act Leopold NF 111(381):79-85

Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ, Deutschland

Sind Ziegen als Sentinels für Frühsummer-Meningoenzephalitis (FSME) in einem "FSME Nicht-Risiko-Gebiet" geeignet?

Es wird über Untersuchungen auf FSME-Virus-spezifische Antikörper sowie FSME Virus RNA in einer Ziegenherde berichtet, die sich über das gesamte Jahr auf einer Weide in einem FSME Nicht-Risiko-Gebiet in Thüringen befand, in dem in der Vergangenheit äußerst selten einzelne humane FSME-Fälle auftraten. Die Untersuchungen wurden wiederholt zwischen Oktober 2008 und Dezember 2009 durchgeführt. Erstaunlicherweise wies dabei eine Ziege, welche diese Weide niemals verlassen hatte, spezifische FSME-Virus-Antikörpertiter auf. Um diese Ergebnisse eines Kontakts zu FSME-Viren via Zeckenstich mit einem definierten Kontakt zu FSME-Virus-Antigen vergleichen zu können, wurden zwei Ziegen experimentell immunisiert. Beide Tiere entwickelten FSME-Virus-Antikörpertiter, allerdings ein Tier zeitverzögert und erst nach mehrfachem Antigenkontakt. Außerdem wurden auf der Weide im Mai und Juni 2009 177 Zecken gesammelt. In keiner der Zecken wurde jedoch FSME-Virus RNA gefunden. Nach diesem Ergebnis könnten Ziegen als Sentinels für die Bewertung des FSME-Risikos in einer Region geeignet sein, was in weiteren Untersuchungen an einer großen Tierzahl verifiziert werden sollte.

KLAUS *et al.* 2010. Can goats be used as sentinels for Tick-borne encephalitis (TBE) in non-endemic areas? Experimental studies and epizootiological observations. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 123:10-14

Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ und IVD; Thüringer Tierseuchenkasse, Tiergesundheitsdienst, Jena (alle Deutschland)

FSME-Seroprävalenz bei Affen (*Macaca sylvanus*) und Schafen nach natürlicher Zeckenstichexposition und FSME Virus Prävalenz in Zecken in einem FSME-Risikogebiet in Deutschland

Es wurden in einem FSME-Risikogebiet, in dem in einer vorherigen Studie schon eine schwere FSME-Erkrankung beim Affen beschrieben sowie ein FSME-Stamm isoliert und sequenziert worden waren, alle verfügbaren Daten zur Charakterisierung eines FSME-Risikogebietes zusammengetragen wie die Anzahl der FSME-Erkrankungen bei Mensch und Tier, der Nachweis von FSME Virus in Zecken und der Nachweis von FSME Virus spezifischen Antikörpern bei Tieren. Es wurden 294 Zecken sowie 283 Seren von Affen vom Affenberg Salem, Bodenseekreis, und 100 Seren von Schafen, die in der Umgebung des Affenberges weideten, untersucht. Die Seroprävalenz bei Affen lag bei 2,6 % und bei Schafen bei 9 %. Mit zwei Realtime RT-PCR Protokollen, davon einer neu entwickelten Realtime RT-PCR, wurden die 294 Zecken untersucht, jedoch kein FSME Virus gefunden. Dies konnte lediglich in früheren Studien aus der Region gefunden werden.

KLAUS *et al.* 2010. Seroprevalence of tick-borne encephalitis (TBE) in naturally exposed monkeys (*Macaca sylvanus*) and sheep and

prevalence of TBE virus in ticks in a TBE endemic area in Germany. Ticks Tick-borne Dis 1:141-144.

Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ und IVD; Labor ALOMED, Radolfzell; Affenberg Salem, Bodenseekreis; Schafherdengesundheitsdienst Baden-Württemberg, Aulendorf (alle Deutschland); Department für Virologie, Medizinische Universität Wien (Österreich)

2 BAKTERIEN

2.1 CLOSTRIDIEN

Clostridien sind grampositive, anaerob wachsende Stäbchen mit der Fähigkeit zur Sporenbildung. Die meisten Arten aus der Familie der *Clostridiaceae* verursachen keine Krankheiten und sind zum Teil von biotechnischem Nutzen. Einige Arten gelten vor allem aufgrund der von ihnen produzierten Toxine als gefährliche Krankheitserreger.

Entwicklung und Validierung einer Multiplex Real-Time PCR zur Detektion von *Clostridium chauvoei* und *Clostridium septicum*

Der Rauschbrand ist eine seuchenhaft und akut verlaufende, infektiöse, aber nicht kontagiöse Gasödemkrankheit, die meist junge Rinder sowie gelegentlich Schafe und Ziegen befällt. Infektionen mit diesem Erreger (*Clostridium (C.) chauvoei*) sind anzeigepflichtig. Der Krankheitsverlauf ist durch die Bildung von Gasödemem im Muskelgewebe gekennzeichnet und führt unbehandelt rasch zum Tod. Die Erkrankung tritt in bestimmten Gebieten gehäuft auf und wird trotz des möglichen seuchenhaften Verlaufs nicht von Tier zu Tier übertragen. Neben *C. chauvoei* sind weitere Clostridien als typische Erreger von Gasödeminfektionen bekannt, insbesondere *C. septicum*, der Erreger des Pararauschbrands. Die PCR stellt eine kostengünstige, sensitive und schnelle Methode dar, den Rauschbranderreger nachzuweisen und von *C. septicum* abzugrenzen. Im Rahmen einer Validierungsstudie wurden drei publizierte PCR-Assays getestet sowie ein qualitativer Multiplex-Real-Time PCR-Assay etabliert. Zwei der konventionellen PCR-Assays amplifizieren DNA-Sequenzen der 16S-23S rDNA Spacer-Region. Beide Assays wiesen eine Spezifität von 100 % auf. Ein weiterer konventioneller PCR-Assay, bei dem ein Fragment des Flagellin-Gens amplifiziert wird, war für alle 38 *C. septicum* Stämme spezifisch. Es konnte jedoch nur bei 26 der 29 getesteten *C. chauvoei* Stämme das erwartete 535 bp Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden.

Als weiteres Nachweissystem zur Detektion des Rauschbranderreger und des Pararauschbranderreger wurde ein qualitativer Multiplex-Real-Time PCR-Assay etabliert. Für die Entwicklung des Assays wurde zunächst ein Fragment des *spo0A*-Genes von

C. septicum und *C. chauvoei* sequenziert. Die aus den Sequenzdaten abgeleiteten degenerierten PCR-Primer ermöglichen die Amplifikation eines 149 bp Fragmentes bei allen zuvor getesteten *C. chauvoei* und *C. septicum* Stämmen. Die spezifische Detektion von *C. chauvoei* und *C. septicum* erfolgte jeweils mittels FAM- und HEX-markierter DNA-Sonden. Der Real-Time PCR-Assay wurde an 29 Gewebeproben aus 19 Rauschbrandfällen getestet und mit den Ergebnissen der konventionellen PCR-Assays verglichen.

LANGE *et al.* 2010. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. Mol Cell Probes 24:204-210.

Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ

2.2 SALMONELLEN

Salmonellen sind gramnegative, begeißelte Stäbchen, die akut bis chronisch oder symptomlos verlaufende Infektionskrankheiten verursachen können, deren Auftreten bei vielen Tierarten und auch beim Menschen beschrieben ist. Neben tierartadaptierten *Salmonella*-Serovaren sind häufig auch virulente nicht-tierartadaptierte Serovaren wie *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis für enterale und systemische Erkrankungen bei verschiedenen Wirtstieren verantwortlich. Besondere Bedeutung besitzen *Salmonella*-Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren als Ursache für *Salmonella*-Infektionen des Menschen (Zoonose).

Induktion eines homologen und heterologen Invasionshemmungseffektes durch die Applikation von *Salmonella*-Stämmen an Eintagsküken

Die Immunisierung des Geflügels mit Lebend- und Inaktivimpfstoffen ist ein wichtiges Verfahren, um die Widerstandsfähigkeit der Tiere gegen eine *Salmonella*-Infektion zu erhöhen. Neben der Induktion einer adaptiven Immunantwort sind *Salmonella*-Lebendimpfstoffe darüber hinaus auch in der Lage, bereits kurze Zeit nach der Applikation protektive Mechanismen zu induzieren.

Die Vorbehandlung von Eintagsküken mit *Salmonella*-Stämmen führt zu einem nach wenigen Stunden wirksamen intestinalen Kolonisationshemmungseffekt gegen nachfolgend verabreichte *Salmonella*-Infektionsstämme. Dieser Effekt ist am stärksten zwischen den Stämmen einer Serovar ausgeprägt. Es ist jedoch nicht bekannt, ob und in welchem Umfang die Applikation von *Salmonella*-Wild- oder Impfstämmen auch zur Induktion eines systemischen Invasionshemmungseffektes gegen andere *Salmonella*-Serovaren führen kann. In unseren Untersuchungen wurden potenziell protektive *Salmonella*-Wildstämme der Serovaren Enteritidis und Infantis i) auf ihr Vermögen zur intestinalen Besiedelung, zur systemischen Invasion in innere Organe, zur Induktion eines Granulozyteneinstroms in die Darmschleim-

haut und ii) auf ihre Fähigkeit zur Induktion eines homologen und heterologen Invasionshemmungseffektes gegen nachfolgend applizierte *Salmonella*-Wildstämme getestet. Der sehr invasive Stamm *Salmonella* Enteritidis induzierte einen nach wenigen Stunden beginnenden starken Einstrom von Granulozyten aus dem Blut in die Darmschleimhaut, der zu einer vollständigen Hemmung der systemischen Invasion von sowohl homologen als auch heterologen *Salmonella*-Infektionsstämmen führte, die 24 Stunden später appliziert wurden. Die Vorbehandlung mit dem weniger invasiven Stamm *Salmonella* Infantis führte nur zu einem geringen Granulozyteneinstrom in das Darmgewebe und einer vollständigen Invasionshemmung der nachfolgend inokulierten homologen Serovar *Salmonella* Infantis. Die Invasion von heterologen *Salmonella*-Serovaren wurde jedoch nur unvollständig gehemmt. Dieser bisher beim Geflügel nicht beschriebene Invasionshemmungseffekt zwischen *Salmonella*-Serovaren sollte zukünftig bei der Entwicklung neuartiger *Salmonella*-Lebendimpfstoffe Berücksichtigung finden, um eine frühzeitige extraintestinale Invasion und eine mögliche Organmanifestation von *Salmonella*-Wildstämmen beim Geflügel zu verhindern.

METHNER *et al.* 2010. Induction of a homologous and heterologous invasion-inhibition effect after administration of *Salmonella* strains to newly hatched chicks. *Vaccine*, 28:6958-6963.

Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ und IMP; University of Nottingham (UK)

Charakterisierung aviärer gamma/delta T-Zell-Subpopulationen nach *Salmonella*-Typhimurium-Infektion von Hühnerküken

Im Vergleich zu Maus und Mensch lassen sich gamma/delta ($\gamma\delta$)-T-Lymphozyten im Blut und in Organen von Hühnern häufig nachweisen. Ganz allgemein werden $\gamma\delta$ -T-Zellen als *innate-like* Zellen betrachtet, deren Anzahl nach *Salmonella*-Infektion signifikant ansteigt. Es wird angenommen, dass einzelne Subpopulationen von $\gamma\delta$ -T-Zellen verschiedene Funktionen im Immunabwehrgeschehen ausüben. Im Hühnerküken wurden in Abhängigkeit von der Expression des CD8-Moleküls bereits folgende $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen definiert: CD8 α $\gamma\delta$ -T-Zellen, CD8 α^{+dim} und CD8 α^{+high} $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die CD8 α^{+high} $\gamma\delta$ -T-Zellen bestehen ihrerseits aus einer CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer- und einer CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer-exprimierenden Subpopulation. Die Zusammensetzung der Subpopulationen innerhalb der $\gamma\delta$ -T-Zellen schwankt beim Huhn je nach Alter der Tiere oder untersuchtem Organ.

Zur Bestimmung der bisher unbekanntenen Funktionen aviärer $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen im Immunabwehrgeschehen wurden Eintagsküken oral mit *Salmonella* Typhimurium infiziert. Bis zum 11. Tag nach Infektion wurden das Vorkommen und die Transkription des CD8-Antigens sowie immunologisch relevanter Proteine der CD8 α - und CD8 α^{+high} (CD8 $\alpha\alpha$, CD8 $\alpha\beta$) $\gamma\delta$ -T-Zellen untersucht. Die Analysen erfolgten mittels Durchflusszytometrie und quantitativer

real-time reverse-transcription-PCR in Milz, Thymus, Zäkum und Blut.

Nach *Salmonella*-Infektion der Hühnerküken fand sich ein erhöhter Prozentsatz CD8 α^{+high} $\gamma\delta$ -T-Zellen in Zäkum, Blut und Milz. Innerhalb der CD8 α^{+high} Population stieg der Anteil der CD8 $\alpha\alpha$ $\gamma\delta$ -T-Zellen signifikant an und war von einer reduzierten Transkription der β -Kette des CD8-Antigens begleitet. Darüber hinaus wurde auf der Oberfläche der CD8 α^{+high} Zellen eine verstärkte CD8 α -Expression detektiert. Gleichzeitig zeigten beide CD8 α^{+high} $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen (CD8 $\alpha\alpha$, CD8 $\alpha\beta$) nach Infektion erhöhte Transkriptionsraten der Gene für Fas, FasL, IL-2R α und gamma-Interferon (IFN- γ). Insgesamt steigerten die CD8 $\alpha\beta$ Zellen ihre Transkriptionsraten stärker als die CD8 $\alpha\alpha$ $\gamma\delta$ -T-Zellen, wohingegen die CD8 $\alpha\beta$ Zellen nach Infektion durchweg höchste Transkriptionslevel aufwiesen.

Erstmals konnte nach *Salmonella*-Infektion von Hühnerküken ein verändertes Transkriptionsmuster der verschiedenen aviären $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulation nachgewiesen werden. Während die CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta$ $\gamma\delta$ -T-Zellen erhöhte Transkriptionsraten für eine Reihe hier untersuchter immun-relevanter Proteine zeigten, reagierten die CD8 α -Zellen nach *Salmonella*-Typhimurium-Infektion der Hühnerküken kaum. Insbesondere der nachweislich erhöhte Prozentsatz der aviären CD8 $\alpha\alpha$ $\gamma\delta$ -T-Zellen in Zäkum, Milz und Blut, verbunden mit einer gesteigerten Transkription von IFN- γ und anderen immunologisch bedeutsamen Proteinen nach Infektion, weist auf eine aktive Rolle dieser $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten-Subpopulation im Abwehrgeschehen gegenüber einer *Salmonella*-Typhimurium-Infektion im Hühnerküken hin.

PIEPER *et al.* 2010. Characterization of avian gamma/delta T-cell subsets after *Salmonella* Typhimurium infection of chicks. *Infect Immun* [Epub ahead of print; IAI.00788-10 [pii];10.1128/IAI.00788-10 [doi]]

Fachhochschule Jena; Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ und IMP

2.3 CHLAMYDIEN

Chlamydien sind obligat-intrazelluläre Prokaryoten mit einer Zellwand, die im Unterschied zu typischen gramnegativen Bakterien kein Peptidoglykan enthält. Ihre Hülle besteht aus äußerer und innerer Membran mit einem veränderlichen periplasmatischen Raum. Ein charakteristischer Bestandteil der Außenmembran ist das Lipopolysaccharid mit einem für Chlamydien spezifischen Epitop im KDO-Trisaccharid. Daneben macht das Major Outer Membrane Protein A (MOMP) bis zu 60 % der Proteinfraction dieser Membran aus. Man unterscheidet zwei morphologische Erscheinungsformen dieser Mikroorganismen, die relativ kleinen Elementarkörper (0,2-0,6 μ m Durchmesser), welche extrazellulär vorkommen, infektiös sind, jedoch metabolisch inaktiv, und die vergleichsweise größeren Retikularkörper

(bis 1,5 µm Durchmesser), welche in zytoplasmatischen Einschlüssen existieren, sich dort vermehren und metabolisch aktiv sind.

Nach der jetzt gültigen Taxonomie wird die Familie in die Genera *Chlamydia* (C.) mit den Spezies *C. trachomatis*, *C. suis* und *C. muridarum* sowie *Chlamydophila* (Cp.) mit *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* und *Cp. pneumoniae* unterteilt.

Erstbeschreibung von *Chlamydophila caviae* in Pferden

In einem Gestüt von Trakehner-Pferden zeigten alle 33 Fohlen einer Geburtskohorte Symptome einer Bindehautentzündung sowie seröser bis schleimig-eitriger Rhinitis. Darüber hinaus konnten bei 7 älteren Pferden wiederkehrende Zeichen einer Bindehautentzündung diagnostiziert werden. Diese Symptome veranlassten die Untersuchung von Nasen- und Augentupfern, die sowohl mittels Bakterien- und Zellkultur als auch mit molekularbiologischen Methoden wie Real-Time-PCR, DNA-Mikroarray und DNA-Sequenzierung analysiert wurden. Diese Arbeiten führten zur Identifizierung von *Chlamydophila* (C.) *caviae* (bei 5/6 Fohlen) und *Streptococcus* (S.) *equi* subsp. *zooeidemicus* (bei 4/6 Fohlen).

Der alleinige Nachweis von *C. caviae* bei Pferden mit Bindehautentzündung, die wiederkehrenden klinischen Symptome bei den betroffenen Tieren sowie das Fehlen einer nachhaltigen klinischen Wirkung der Antibiotika-Therapie mit Trimethoprim-Sulfonamid, Enrofloxacin und Amoxicillin sprechen für eine persistente Infektion von Pferden mit *C. caviae* und/oder eine Zirkulation des Erregers im Pferdebestand. Das zeitgleiche Auftreten von *C. caviae* und *S. equi* subsp. *zooeidemicus* in Nasen- und Augentupfern bei erkrankten Tieren lässt darüber hinaus einen synergistischen Effekt beider Erreger möglich erscheinen, bei dem primäre Läsionen durch *C. caviae* gesetzt und anschließend durch *S. equi* subsp. *zooeidemicus* verstärkt wurden. Die Erstbeschreibung von *C. caviae* in Pferden wirft neue Fragen zur Bedeutung dieses Erregers und seines natürlichen Wirtsspektrums auf, die Gegenstand weiterer Untersuchungen sind.

GAEDE *et al.* 2010. Detection of *Chlamydophila caviae* and *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* in horses with signs of rhinitis and conjunctivitis. *Vet Microbiol* 142:440-444.

Landesamt für Verbraucherschutz - Fachbereich Veterinärmedizin, Stendal; Friedrich-Loeffler-Institut, IMP und IBIZ

Entwicklung eines DNA-Mikroarrays zur Genotypisierung von *Chlamydia trachomatis*

Die bisher üblichen Methoden zur Genotypisierung von *Chlamydia* (C.) *trachomatis* wie PCR-RFLP und Sequenzierung basieren auf der Variabilität des *ompA* Gens. Dieses kodiert das Protein MOMP und besteht aus vier variablen Domänen (VD1 - VD4), welche von insgesamt fünf konser-

vierten Domänen flankiert werden. Die o. g. Typisierungsmethoden haben jedoch Defizite bezüglich ihrer Schnelligkeit, Handlichkeit und Flexibilität. Aus diesem Grunde wurde ein auf *ompA* basierender DNA-Mikroarraytest entwickelt. Damit können alle 17 anerkannten *C. trachomatis*-Serovare korrekt identifiziert und differenziert werden. Die hohe Spezifität dieses DNA-Mikroarrays wird mit Hilfe von 61 Oligonukleotid-Sonden erreicht, welche auf dem Genotypspezifischen Polymorphismus in VD1, 2 und 4 des *ompA* Gens beruhen. Die Amplifikation dieser variablen Domänen erfolgt durch eine Multiplex-PCR mit Biotin-Einbau. Für die anschließende Hybridisierung steht dem Anwender zum einen die ArrayTube-Plattform (Tube-integrierter Chip) zur Analyse einer kleinen Probenanzahl zur Verfügung. Darüber hinaus gewährleistet die ArrayStrip-Plattform (8er Streifen im Mikrotiterformat) einen höheren Probanddurchsatz.

Die Arbeiten offenbarten mit Blick auf die Sensitivität des DNA-Mikroarrays, dass der Genotyp bis zu einer Nachweisgrenze von einer Einschluss-bildenden Einheit (EBE) korrekt bestimmt werden kann. Weiterhin zeigte eine parallele Analyse von insgesamt 62 klinischen Proben, die sowohl mittels PCR-RFLP als auch mit dem DNA-Mikroarray untersucht wurden, in allen Fällen eine korrekte Genotypisierung. Somit konnte die Eignung des DNA Mikroarray-Tests zur Genotypisierung von *C. trachomatis* sowohl für epidemiologische Studien als auch zur Routinediagnostik aufgezeigt werden.

RUETTGER *et al.* 2010. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains from culture and clinical samples using an *ompA*-based DNA microarray assay. *Mol Cell Probes* Oct 8. [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.mcp.2010.09.004]

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP; CLONDIAG GmbH, Jena (alle Deutschland); VU University Medical Center, Amsterdam, Center for Infection and Immunity Amsterdam, Public Health Service, Amsterdam (alle Niederlande); Uppsala University (Schweden)

Chlamydien in Rinderbeständen – Kommensalen, Wegbereiter oder Krankheitserreger?

Mit der Verfügbarkeit moderner molekularbiologischer diagnostischer Verfahren wurde deutlich, dass chlamydiale Infektionen in Rinderbeständen nahezu ubiquitär verbreitet sind. Die bisher beim Rind nachgewiesenen Spezies umfassen *Chlamydophila* (C.) *pecorum*, *C. abortus*, *C. psittaci* und *Chlamydia suis*, wobei Mischinfektionen mit mindestens zwei Spezies innerhalb einer Herde und selbst innerhalb eines Tieres keine Seltenheit sind. Die häufigen Nachweisraten (serologische Prävalenzen von 60 - 100 %) stehen im Missverhältnis zu den relativ selten zu beobachtenden Chlamydien-assoziierten klinisch manifesten Erkrankungen. Aus dieser offensichtlichen Diskrepanz resultieren Fragen nach der ätiologischen und pathogenetischen Bedeutung von Chlamydien im Rind. Gezielte Feldstudien wie auch experimentelle Untersuchungen der letzten 5 - 10 Jahre haben gezeigt, dass chlamydiale Infektionen beim Rind eher subklinisch verlaufen und chronisch-persistierenden bzw.

rekurrierenden Charakter haben. Trotz klinischer Inapparenz vollziehen sich in den Organsystemen mit chlamydialer Besiedlung diverse strukturelle und funktionelle Veränderungen, die den allgemeinen Gesundheitsstatus der betroffenen Tiere – und damit das Leistungspotenzial der gesamten Herde – nachhaltig beeinträchtigen. Typische Beispiele hierfür sind subklinische Mastitiden und Fruchtbarkeitsstörungen bei Milchkühen oder Beeinträchtigungen von Lungen- und Körpermasse-Entwicklung bei Kälbern. Diesen subklinischen chlamydialen Infektionen kommt auf Herdenbasis vermutlich eine größere ökonomische Bedeutung zu als bislang angenommen. Faktoren des Herdenmanagements und des allgemeinen Hygienestatus haben nachgewiesenermaßen einen bedeutenden Einfluss auf das Risiko von Chlamydien-Infektionen in Rinderbeständen. Weiterer Forschungsbedarf besteht bezüglich (1) der Etablierung relevanter Tiermodelle zur Aufklärung der Pathogenese, (2) effektiver Bekämpfungsstrategien unter Einbeziehung der Entwicklung von Subunit-Vakzinen, sowie (3) der Aufklärung des zoonotischen Risikos boviner Chlamydiosen auf der Basis noch zu entwickelnder Spezies-spezifischer sero-diagnostischer Methoden.

REINHOLD *et al.* 2010. *Chlamydiaceae* in cattle – commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet J* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.tvjl.2010.01.008]

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP, Auburn University, Auburn, Alabama (USA)

Infektionen mit *Chlamydia suis* beim Schwein sind durch praxisübliche antimikrobielle Behandlungen nicht effektiv zu eliminieren

Im Rahmen des Gesundheitsmonitorings bei der Einstellung von Schweinen aus Praxisbetrieben in eine tierexperimentelle Einheit des FLI wurde die Präsenz von *Chlamydia suis* (in Rektaltupfer- und Nasentupferproben) sowie von *Chlamydomydia psittaci* (nur in Nasentupferproben) in klinisch unauffälligen Schweinen ($n = 47$) detektiert. Die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR machten deutlich, dass die Quantität an chlamydialer DNA in den rektal gewonnenen Proben deutlich höher war als in den nasal gewonnenen. In Vorbereitung eines geplanten Tierversuchsvorhabens wurden alle Tiere intramuskulär mit Enrofloxacin behandelt (Gruppe I: 4 mg/kg tgl. über 5 Tage, $n = 22$; Gruppe II: 2.5 mg/kg tgl. über 3 Tage, $n = 25$). Zusätzlich erhielten die Tiere der Gruppe II Tiamulin. Die antimikrobiellen Behandlungen reduzierten zunächst sowohl die Anzahl der positiv getesteten Tiere als auch die Quantität chlamydialer DNA in den positiv getesteten Tupfern. Dieser Effekt war jedoch nicht nachhaltig. Bereits wenige Tage nach der letzten Antibiotika-Gabe stiegen die Nachweise für chlamydiale DNA wieder an und erreichten quantitativ spätestens nach ca. 10 Tagen das Niveau vor Behandlungsbeginn. Als Schlussfolgerung aus dieser Studie ist festzustellen, dass natürlich

vorkommende subklinische Chlamydien-Infektionen des Schweines nicht durch antimikrobielle Behandlungen in praxisüblicher Dosierung und Anwendungsdauer zu eliminieren sind. Außerdem stützt die Beobachtung der rekurrierenden Ausscheidung von Chlamydien die Hypothese, dass diese Erreger unter dem Einfluss von Antibiotika im Wirt persistieren können.

REINHOLD *et al.* 2010. Recurrence of *Chlamydia suis* infection in pigs after short-term antimicrobial treatment. *Vet J* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.tvjl.2010.01.008]

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP

2.4 MYKOBAKTERIEN

Mykobakterien sind obligat aerobe, grampositive und unbewegliche Stäbchen. Die komplexe, lipidreiche Zellwand schützt diese Bakterien gegen Austrocknung, extreme pH-Werte und andere umweltbedingte Stressoren.

2.4.1 Paratuberkulose

Der Erreger der Paratuberkulose (Johnesche Krankheit), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), tritt in vielen Ländern bei Rind, Schaf und Ziege endemisch auf und verursacht hohe ökonomische Verluste für die Fleisch- und Milchindustrie. Die Rolle von MAP in der Ätiologie des Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung des Menschen, wird bis heute kontrovers diskutiert. Trotz ihrer großen Bedeutung ist die Pathogenese der Paratuberkulose nur teilweise aufgeklärt. Für die Untersuchung dieses komplexen Prozesses wurden und werden verschiedene Ansätze verfolgt. Die immunmodulatorischen Eigenschaften verschiedener MAP-Genotypen wurden im *In-vitro*-Zellkulturmodell (humane Monozytenzelllinie THP1) verglichen und stammesspezifische Unterschiede nachgewiesen. Des Weiteren konnten *in vivo* Proteine charakterisiert werden, die MAP im Wirt bei einer klinischen Infektion exprimiert.

Differentielle Proteomanalyse von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Mykobakterielle Membranproteine, die während einer Infektion exprimiert werden, scheinen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Paratuberkulose zu spielen und stellen daher mögliche virulenzassoziierte Faktoren dar. Aus diesem Grund wurden Membran-angereicherte Fraktionen untersucht, die zum einen direkt aus der intestinalen Mukosa von drei Kühen zweier Herden mit Paratuberkulose im klinischen Stadium, zum anderen aus *in vitro* kultivierten MAP-Isolaten dieser Tiere gewonnen wurden.

Die Isolate der drei Kühe (je 3 bzw. 4 Isolate, aus verschie-

denen Geweben stammend) wurden mit Hilfe der RFLP-, MIRU-VNTR-, und MLSSR-Analyse hochauflösend charakterisiert und zeigten insgesamt zwei Genomprofile. In den verschiedenen Geweben bzw. im Kot der Einzeltiere bzw. von Tieren aus gleichen Herden wurden dabei jeweils identische Profile detektiert. SDS-PAGE-basierte Proteinmuster in den Membranpräparationen aus der Mukosa und den kultivierten MAP-Isolaten der drei Kühe korrelierten nicht mit den beiden Genomprofilen.

Mittels 2D DIGE und MALDI-TOF-MS Analyse konnten vier differentiell exprimierte Proteine detektiert werden, eins davon ein vorausgesagtes Membranprotein. Bei Verwendung der „nanoflow-liquid-chromatography-coupled tandem mass spectrometry“ (UPLC-gestützte ESI Q-TOF-MS/MS) mit vorangegangenem Trypsin-Aufschluss wurden insgesamt 84 *in vivo* exprimierte MAP-Proteine in Mukosa-Membranfraktionen von 2 Kühen gefunden. 48 dieser Proteine wurden als Membran-assoziiert vorausgesagt, davon 13 als Virulenz-assoziiert für Mykobakterien und 13 als bisher uncharakterisiert; 44 waren identisch mit Membran-assoziierten Proteinen in den kultivierten MAP-Isolaten. Alle Membran-assoziierten Proteine, besonders die vier differentiell *in vivo* exprimierten, könnten potentielle Zielstrukturen für weitere Untersuchungen zur Pathogenese der Paratuberkulose sein.

WEIGOLDT *et al.* 2010. Differential proteome analysis of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* grown *in vitro* and isolated from cases of clinical Johne's disease. Microbiology [Epub ahead of print; doi:10.1099/mic.0.044859-0]

Tierärztliche Hochschule Hannover; Justus-Liebig-Universität Gießen; Friedrich-Loeffler-Institut, IMP (alle Deutschland)

2.5 MYKOPLASMEN

Mykoplasmen gehören zur Klasse *Mollicutes* (Weichhäuter) und sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Organismen. Auf Grund ihrer Größe von nur 100-300 nm können sie bakteriendichte Filter passieren. In Vertebraten kolonisieren sie vor allem die Schleimhäute des Atmungsapparates und des Urogenitaltraktes. An diese pathogene bzw. kommensale Lebensweise im Wirt haben sich die Mykoplasmen im Ergebnis einer reduktiven Evolution perfekt angepasst, was zur Entstehung eines beinahe minimalen Genoms führte. Im Gegensatz zu den stammesgeschichtlich nah verwandten grampositiven Bakterien besitzen Mykoplasmen keine Zellwand, was ihnen eine natürliche Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verleiht. Etwa ein Dutzend Arten der Gattung *Mycoplasma* (*M.*) spielen eine Rolle als Krankheitserreger bei Tier und Mensch (z. B. *M. mycoides* ssp. *mycoides*, *M. bovis*, *M. gallisepticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*). Weitere Vertreter können als Kontaminanten in Zellkulturen in Erscheinung treten (*M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*).

Quantitativer Nachweis von *Mycoplasma bovis* bei Mastitiden und respiratorischen Erkrankungen von Rindern

Die weitgehende Unwirksamkeit immunprophylaktischer Maßnahmen und antibiotischer Therapien gehört zu den charakteristischen Problemen bei *Mycoplasma* (*M.*) *bovis*-Infektionen des Rindes. Unsere Arbeitshypothese ging von der Annahme aus, dass das quantitative Niveau der Erregerausscheidung den Zustand der aktuellen Infektion im Tier widerspiegeln könnte. Daher führten wir eine Untersuchung an Milchproben von infizierten Herden mit Mastitisproblemen mittels Real-Time-PCR durch, bei der eine in unserem Labor neu entwickelte Methode zum Einsatz kam. Es zeigte sich tatsächlich, dass der Gehalt des Erregers *M. bovis* in Beständen mit klinischer Mastitis signifikant höher ($P < 0.001$) als in klinisch gesunden Herden war. In letzteren persistierte der Keim über lange Zeiträume. Ein analoges Bild bot sich in Kälberbeständen mit anhaltenden respiratorischen Problemen, wo *M. bovis* häufiger in Konjunktivaltupfern symptomatischer Tiere im Vergleich zu klinisch gesunden Tieren gefunden wurde. Das neu entwickelte Real-Time-PCR-Verfahren erwies sich als spezifisch für *M. bovis* und gestattete den Nachweis von mindestens 100 Kolonie-bildenden Einheiten je Milliliter Milch.

SACHSE *et al.* 2010. Use of a novel RT-PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. Vet J 186:299-303.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP, IBIZ und INNT; Beni-Suef University, Beni-Suef (Ägypten)

Identifizierung neuer Antigene für die Diagnostik der Lungenseuche

Die Lungenseuche der Rinder, hervorgerufen durch *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type, ist eine schwere respiratorische Erkrankung, welche beträchtliche ökonomische Verluste verursacht, insbesondere in den afrikanischen Ländern südlich der Sahara. Die Bekämpfung dieser Erkrankung wird auch dadurch beeinträchtigt, dass die üblichen serologischen Tests nur für die Herdendiagnostik bestimmt und nicht für die Einzeltierdiagnostik einsetzbar sind.

Im Projekt wurden 22 potenziell immunogene Antigene des kenianischen Ausbruchsstammes B237 mittels Phage-Display-Technik identifiziert. Wir bestimmten die relative Immunogenität, die diskriminatorische Kapazität zur Unterscheidung zwischen positiven und negativen Seren und die Kreuzreaktivität mit Kaninchen-Hyperimmunseren gegen 15 verschiedene Mykoplasmen-Spezies. Als die drei besten Kandidaten für diagnostische Tests erwiesen sich ein konserviertes hypothetisches Protein, eine Glykosyl-Transferase und Azyl-Carrier-Protein-Phosphodiesterase. Diese wurden als GST-Fusionsproteine in *Escherichia coli* exprimiert, aufgereinigt und in einem ELISA zur Beschichtung an die feste Phase verwendet. Zur Ermittlung des diagnostischen Poten-

tials dieser rekombinanten Proteine wurden Seren von 10 experimentell infizierten Rindern und von 6 Kontrolltieren eingesetzt. Der entwickelte Prototyp des ELISA hat eine diagnostische Sensitivität und Spezifität von 100%. Die diagnostische Sensitivität der Komplement-Bindungs-Reaktion sowie des kompetitiven ELISA betragen im Vergleich dazu 70 % bzw. 60 %.

NASEEM *et al.* 2010. Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet Microbiol* 142:285-92.

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ; Technische Universität Braunschweig (alle Deutschland); International Livestock Research Institute, Nairobi (Kenia)

2.6 ESCHERICHIA COLI (EHEC)

Microarray-basierte Genotypisierung von Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) des Serotyps O156:H25/H-/Hnt isoliert von Rindern und deren klonale Analyse

In dieser Studie wurden EHEC der Serogruppe O156 untersucht. EHEC aus dieser Serogruppe konnten, wenn auch selten, von humanen Durchfall- bzw. asymptomatisch erkrankten Patienten isoliert werden, wobei Rinder auch für diese Serogruppe das vorrangige Reservoir sind.

Insgesamt konnten 32 *E. coli*-Isolate, die mittels Agglutinationsreaktionen als O156:H25/H-/Hnt serotypisiert worden waren, in die Studie einbezogen werden. Alle Stämme waren während eines Monitoring-Programms aus drei verschiedenen Betrieben bei Rindern über einen Zeitraum von 21 Monaten isoliert worden. Die Charakterisierung aller Isolate erfolgte mittels Microarray-basierter Genotypisierung unter Verwendung des miniaturisierten *E. coli*-Oligonukleotid-Arrays im Array-Strip-Format (CLONDIAG GmbH Jena).

25 der 32 Isolate konnten mittels DNA-basierter Serotypisierung als O156:H25 bestätigt werden. In der MLST-Analyse konnten alle EHEC O156:H25 den Sequenztypen ST 300 und ST 688 zugeordnet werden, die sich nur durch einen Nukleotidaustausch im *purA*-Gen unterscheiden. Die *E. coli*-Oligonukleotid-Microarrays ermöglichen den gleichzeitigen Nachweis eines wesentlich breiteren Spektrums an EHEC-assoziierten und anderen *E. coli*-Virulenzmarkern als dies bei anderen Methoden erfolgen kann. Alle Isolate zeigten ein breites Spektrum an typischen EHEC Virulenzmarkern.

Bei der Analyse der räumlichen und zeitlichen Zusammenhänge konnten acht Cluster differenziert werden, wobei die EHEC O156:H25 vier verschiedenen Clustern zugeordnet werden konnten. Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten ließen sich aber auch innerhalb der einzelnen Cluster finden. Die Ergebnisse der Clusteranalyse deuten darauf hin, dass einige O156:H25 Stämme das Potential haben über einen sehr langen Zeitraum in den Betrieben und auch in

Rindern zu persistieren, andere dieses Potential aber nicht zu haben scheinen. Vergleichbare Ergebnisse konnten wir auch schon bei EHEC anderer Serovare (O165:H25, O26:H11) finden.

Bei dem breiten Pattern an EHEC-relevanten Virulenzmarkern, das wir bei den *E. coli* O156:H25 finden konnten, stellen auch Isolate bovinen Ursprungs von diesem Serovar ein erhöhtes Risiko für humane Infektionen dar. Unsere Ergebnisse zeigten auch, dass die miniaturisierten *E. coli*-Oligonukleotid-Arrays ein exzellentes Tool für den sehr schnellen Nachweis einer großen Anzahl an Virulenzmarkern darstellt.

GEUE *et al.* 2010. Rapid Microarray-Based Genotyping of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Serotypes O156:H25/H-/Hnt Isolated from Cattle and Analysis of the Clonal Relationship. *Appl Environ Microbiol* 76:5510-5519.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Alere Technologies GmbH, Jena

2.7 COXIELLEN

Q-Fieber ist eine Zoonose, die durch das gramnegative, aerobe lebende Bakterium *Coxiella burnetii* verursacht wird. In den letzten Jahren wurde vermehrt über Q-Fieber-Erkrankungen beim Menschen berichtet.

Epizootiologie von Q-Fieber bei Wiederkäuern und wild lebenden Säugetieren und differenzierende molekulare Pathogenese von *Coxiella burnetii* bei Mensch und Tier

Im Rahmen eines vom BMBF geförderten Projekts werden Proben sowohl von Haustieren (Rind, Schaf, Ziege) als auch von Wildtieren (Schwarzwild, Rot- und Rehwild, Bisam, Hase) aufgearbeitet und analysiert. Dieses Material stammt aus den unterschiedlichen epizootischen Regionen Deutschlands, wobei humane Q-Fieber-Ausbrüche oder eine bekannte regionale Q-Fieber-Problematik in Wiederkäuerherden die Grundlage für die gezielte Probennahme bei Schaf, Rind und Ziege darstellen. Zur Anwendung kommen hierbei sowohl der direkte Erregernachweis (PCR, Anzucht mittels Zellkultur) wie auch der indirekte Nachweis mittels ELISA und Immunoblot. Ziel ist es, die aktuelle Situation in Deutschland besser zu erfassen. Auf internationaler Ebene hat sich die Arbeitsgruppe an einer von der EFSA in Auftrag gegebenen Studie zur Harmonisierung des Monitorings und Reportings in Europa beteiligt.

CONRATHS *et al.* 2010. Q-Fieber: Zur aktuellen Situation in Deutschland und den Niederlanden. *Tierärztl Umschau* 65:152-159.

DLABOLA *et al.* 2010. Bakterielle Zoonosen bei Nutztieren. *Prakt Tierarzt* 91:986-998.

HENNING K., A. HILBERT and M. RUNGE. 2010. Current Q-Fever situation in Germany and in the Netherlands - epidemiological and zoonotic aspects. *In: Epidemiczne Zagrozenia Dla Zdrowia Czlowieka*, ISBN 978-83-89946-41-6

SIDI-BOUMEDINE *et al.* 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-Fever in animals in the European Union. EFSA-Q-2009-00511, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/48e.htm>

2.8 BAKTERIELLE RESISTENZ-FORSCHUNGEN

Antimikrobielle Wirkstoffe stellen in der Veterinärmedizin unverzichtbare Hilfsmittel bei der Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten dar. Die Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe birgt jedoch die Gefahr, dass die zu bekämpfenden Erreger, aber auch Kommensalen unter dem Selektionsdruck Resistenzen gegenüber den entsprechenden Wirkstoffen entwickeln bzw. erwerben. Für viele bakterielle Erreger aus dem veterinärmedizinischen Bereich liegen bislang nur unzureichende Informationen über die genetischen Grundlagen und die Übertragbarkeit entsprechender Resistenzeigenschaften vor. Die nachfolgend beschriebenen publizierten Projekte zu unterschiedlichen Aspekten der antimikrobiellen Resistenz bei Bakterien von Lebensmittel liefernden Nutztieren, Kleintieren, aber auch Fischen dienen dazu, entsprechende Wissenslücken zu füllen.

Erhebung, Darstellung und Bewertung von Daten zur antimikrobiellen Empfindlichkeit veterinärmedizinisch relevanter Bakterien

Während der vergangenen Dekade ist der Themenkomplex "Antimikrobielle Resistenz bei Bakterien von Tieren" zunehmend in den Fokus des öffentlichen und wissenschaftlichen Interesses gelangt. Die Analyse von Studien zur Resistenz veterinärmedizinisch relevanter Bakterien zeigte, dass sowohl die korrekte Durchführung von *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen als auch die ordnungsgemäße Darstellung der dabei erhaltenen Ergebnisse eine Vielzahl von Fehlerquellen bergen.

Bei der **Methodik der Empfindlichkeitsprüfung** kommt es häufig zu individuellen Veränderungen der Durchführungsvorschriften, wobei entsprechende Abweichungen die verwendeten Medien, die Inokulumdichten, die Inkubationszeiten sowie die Inkubationsbedingungen betreffen. Bei den **Grenzwerten** beobachtet man häufig ein unzulässiges Vermischen von entweder klinischen Grenzwerten und epidemiologischen Cut-off-Werten oder aber klinischen Grenzwerten verschiedener Durchführungsvorschriften. Eine Durchführungsvorschrift und die in ihr enthaltenen Grenzwerte stellen jeweils eine Einheit dar und können nicht beliebig ausgetauscht werden. Weiterhin ist zu beachten, dass jeweils die aktuell gültigen Grenzwerte anzuwenden sind. **Qualitätskontrollen** dienen der internen Kontrolle des jeweiligen Testsystems und sind daher für die *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung unentbehrlich. Die zur Qualitätskontrolle zu verwendenden Stämme sind definiert und können nicht beliebig verändert bzw. gegen laborspezifische Stämme ausgetauscht werden. Die Berechnung der **MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte** erfolgt mittels mathematischer Formeln. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Aussagekraft dieser Werte mit der Größe der Testpopulation steigt

und dass bei kleinen Testpopulationen einzelne Stämme mit hohen MHK-Werten einen überproportionalen Einfluss auf die MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte haben. Für den Begriff der antimikrobiellen **Multiresistenz** gibt es derzeit keine einheitliche Definition. Daher ist es wichtig zu beschreiben, auf welchen Kriterien die Einstufung eines Bakteriums als multiresistent basiert. Hierbei sollten intrinsische Resistenzen außer Acht gelassen werden und nur erworbene Resistenzen Berücksichtigung finden.

SCHWARZ *et al.* 2010. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* 65:601-604 / *Vet Microbiol* 141:1-4.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; MB Consult Limited, Lymington; University of Bradford, Bradford; Elanco Animal Health, Basingstoke; Centre for Infections, Health Protection Agency, London (alle UK); Utrecht University, Utrecht (Niederlande)

Identifizierung eines neuartigen Phenicol-Exportergens, *pexA*, aus nichtkultivierten Bodenbakterien

Nichtkultivierte Bodenbakterien verfügen über eine Vielzahl von antimikrobiellen Resistenzgenen. Die funktionelle Metagenomik stellt ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung nichtkultivierter Bakterien aus der Umwelt dar. In der vorliegenden Studie diente die funktionelle Metagenomik dazu, Bibliotheken klonierter DNA von Bodenproben aus Alaska nach Phenicol-Resistenzgenen zu durchsuchen. Von insgesamt 13201 Mb DNA zeigte ein einziger Klon in *Escherichia coli* verminderte Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol und Florfenicol bei 30°C, nicht aber bei 37°C. Das entsprechende Insert wurde komplett sequenziert und ergab eine Gesamtgröße von 42382 bp. Das Gen für die reduzierte Phenicolempfindlichkeit, *pexA*, wurde durch funktionelle Deletion mittels Transposon-Mutagenese identifiziert.

Das Gen *pexA* kodiert für ein 415 Aminosäuren großes Protein. Es besteht aus elf transmembranalen Domänen und ähnelt stark Efflux-Proteinen der Major Facilitator Superfamily. Strukturelle Vergleiche des PexA-Proteins mit anderen Effluxproteinen, die Florfenicol und/oder Chloramphenicol aus der Bakterienzelle schleusen können, ergaben nur geringe Homologien. Dem *pexA*-Gen vorgeschaltet fand sich eine mögliche Regulatorregion, die stark Translationsattenuatoren von induzierbar exprimierten Phenicol-Resistenzgenen ähnelte. Eine Induktion der *pexA*-Genexpression in Gegenwart von Florfenicol oder Chloramphenicol ließ sich jedoch in *E. coli* nicht nachweisen. Sequenzanalysen der das *pexA*-Gen flankierenden Regionen identifizierten ein 16S rRNA Operon. Die Sequenz dieses Operons zeigte größte Ähnlichkeit zu 16S rRNA Operons von Bakterien der Gattung *Geobacter* bzw. *Desulfomicrobium* und deutete darauf hin, dass diese DNA (inklusive des *pexA*-Gens) höchstwahrscheinlich von einem Umweltbakterium stammte.

LANG *et al.* 2010. Novel florfenicol and chloramphenicol resistance gene discovered in Alaskan soil using functional metagenomics. *Appl Environ Microbiol* 76:5321-5326.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; University of Minnesota, St. Paul, MN; University of Wisconsin, Madison, WI (beide USA)

Identifizierung eines neuen Trimethoprimresistenzvermittelnden Transposons Tn559 in einem porcinen Methicillin-empfindlichen *Staphylococcus aureus* ST398 Isolat

Das neue Trimethoprim-Resistenzgen *dfrK* wurde bisher plasmidlokalisiert und direkt stromabwärts vom Tetrazyklin-Resistenzgen *tet(L)* beschrieben. Bei der Untersuchung koagulasepositiver Staphylokokken von Tieren aus Deutschland wurde lediglich ein porcines *Staphylococcus aureus*-Isolat identifiziert, bei welchem *dfrK* nicht plasmidlokalisiert und nicht mit *tet(L)* verknüpft war. Ziel dieser Studie war, das genetische Umfeld des *dfrK*-Gens bei diesem Isolat zu untersuchen.

Das *S. aureus*-Isolat 2171 wurde mittels Multilocus Sequenz-Typisierung (MLST), *spa*-Typisierung und der Empfindlichkeitsprüfung durch Bouillon-Mikrodilution charakterisiert. Das *dfrK*-Gen und andere Resistenzgene wurden mit spezifischen PCRs nachgewiesen. Die flankierenden Regionen um *dfrK* wurden durch inverse PCRs amplifiziert und die Amplikons sequenziert. Zirkuläre, intermediäre Formen des neuen Transposons wurden mittels PCR detektiert.

Das *S. aureus*-Isolat 2171 gehörte zum MLST-Typ ST398 und wies den *spa*-Typ t034 auf. Es war empfindlich gegenüber Oxacillin und resistent gegenüber Penicillinen [*blaZ*], Makroliden und Linkosamiden [*erm(B)*], Tetrazyklin [*tet(M)*], Enrofloxacin sowie Trimethoprim [*dfrK*]. Sequenzanalysen der flankierenden Regionen von *dfrK* zeigten die Präsenz eines Tn554-ähnlichen Transposon, welches als Tn559 bezeichnet wurde. Während die Transposons Tn559 und Tn554 das gleiche Arrangement der Transposasegene *tnpA*, *tnpB* und *tnpC* zeigen, sind die Tn554-assoziierten Resistenzgene *erm(A)* und *spc* bei Tn559 durch *dfrK* ersetzt. Zwei Rekombinationsstellen, die bei diesem Austausch eine Rolle spielen können, wurden stromauf- und -abwärts vom *dfrK* identifiziert. Tn559 war in die *att554* Sequenz innerhalb des *radC* Gens integriert. Der Nachweis zirkulärer Zwischenformen von Tn559 spricht für die Funktionalität dieses neuen Transposons. Das neue Transposon Tn559 ist ein Beispiel dafür, dass plasmidlokalisierte Gene durch Rekombinationsprozesse Teil eines Transposons werden können. Die Lokalisation von *dfrK* sowohl auf Plasmiden als auch auf einem Transposon erhöht die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Transfers dieses Trimethoprim-Resistenzgens.

KADLEC K. UND S. SCHWARZ. 2010. Identification of the novel *dfrK*-carrying transposon Tn559 in a porcine methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 strain. Antimicrob Agents Chemother 54:3475-3477.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Nachweis des Multiresistenzgens *cfr* bei einem PVL-positiven MRSA USA300 Isolat

Das Resistenzgen *cfr* vermittelt Resistenz gegenüber fünf unterschiedlichen Klassen von Wirkstoffen, den Phenicolen, Linkosamiden, Oxazolidinonen, Pleuromutilinen und Streptogramin A-Antibiotika. Der entsprechende Resistenzphänotyp wurde mit PhLOPS_A abgekürzt. Dieses Gen wurde ursprünglich bei koagulase negativen Staphylokokken von Tieren gefunden. Bislang gibt es nur wenige Nachweise der Präsenz dieses Resistenzgens bei methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Isolaten. In der vorliegenden Studie beschreiben wir den ersten Fall des Nachweises dieses Multiresistenzgens bei einem Vertreter des pandemisch auftretenden, Panton-Valentine Leukozidin (PVL)-positiven ST8-MRSA-IVa/USA300 Klon.

Das *cfr*-Gen wurde bei der retrospektiven Analyse von PVL-positiven MRSA-Stämmen aus den Jahren 1999-2005 in Irland bei dem Isolat M05/0060 entdeckt. Dieses Isolat stammte aus einem oberflächlichen Kopfhautabszess eines 26-jährigen Mannes. Zur Charakterisierung dieses Isolats wurde ein DNA-Mikroarray eingesetzt, der eine Vielzahl von Virulenz-, Resistenz- und Typisierungsmarkern erkennt. Die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung bestätigte, dass das Isolat M05/0060 den *cfr*-assoziierten PhLOPS_A-Phänotyp aufwies. Molekulare Analysen ergaben die Präsenz des Gens *cfr* sowie des Phenicolexportergens *fexA* auf einem neuartigen, mit pSCFS7 bezeichneten, konjugativen Plasmid von etwa 45 kb Größe. Sequenzanalysen von Plasmid pSCFS7 zeigten, dass ein DNA-Segment, welches das komplette *cfr*-Gen, eine inkomplette Insertionssequenz vom Typ IS21-558 und eine Region mit Homologie zu dem DNA Invertasegen *bin3* des Transposons Tn552 von *Bacillus mycoides* aufwies, in das Transposasegen *tnpB* des *fexA*-tragenden Transposons Tn558 integriert war.

Das Auftreten einer multiresistenten, *cfr*-positiven Variante des ST8-MRSA-IVa/USA300-Klon ist eine alarmierende Beobachtung. Darüber hinaus weist der Nachweis des *cfr*-Gens auf einem konjugativen Plasmid auf die Möglichkeit der weiteren Ausbreitung dieses Resistenzgens auf andere Staphylokokken hin.

SHORE *et al.* 2010. Identification and characterization of the multi-drug resistance gene *cfr* in Panton-Valentine Leukocidin-positive ST8-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-IVa (USA300). Antimicrob Agents Chemother 54:4978-4984.

University of Dublin (Irland); Alere Technologies GmbH, Jena; Technische Universität Dresden; Friedrich-Loeffler-Institut, ING (alle Deutschland)

Charakterisierung boviner Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 Isolate aus Mastitisfällen

In den letzten Jahren wurden häufig MRSA-Isolate des Multi-Locus Sequenztyps ST398 bei Schweinen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu gibt es vergleichsweise wenige Studien

zum Vorkommen und den Eigenschaften von MRSA bei Rindern.

In dieser Studie wurden 25 bovine und zwei humane MRSA-Isolate aus 17 Betrieben in Deutschland untersucht. Die bovinen Isolate stammten aus Fällen klinischer Mastitis, während die Isolate von Menschen aus Nasentupfern stammten. Die Untersuchung der genetischen Verwandtschaft erfolgte mittels Apal-Makrorestriktionsanalyse, *spa*-, *SCCmec*-, und *dru*-Typisierung. Zur Empfindlichkeitstestung wurde die Bouillon-Mikrodilution eingesetzt. Der Nachweis von Resistenz- und Virulenzgenen erfolgte über einen diagnostischen Microarray (StaphyType, Alere Technologies GmbH, Jena) und spezifische PCRs.

Die Isolate zeigten insgesamt neun verschiedene Apal-Hauptmuster. Es wurden drei verschiedene *spa*-Typen (t011, t034, t2576), zwei verschiedene *SCCmec*-Typen (IV, V) und ein nicht typisierbares Isolat sowie fünf verschiedene *dru*-Typen (dt6j, dt10a, dt10q, dt11a, dt11ab) nachgewiesen. Dabei waren t011, *SCCmec* V und dt11a am häufigsten. Die *dru*-Typen dt6j und dt11ab wurden im Rahmen der Studie erstmals beschrieben. Zehn verschiedene Resistenzmuster wurden ermittelt, wobei 11 Isolate (40,7 %) nur Resistenz gegenüber β -Laktamen und Tetrazyklinen aufwiesen. Es wurden die Resistenzgene *blaZ* (Penicilline), *tet(M)*, *tet(K)* und *tet(L)* (Tetrazykline), *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* und *erm(T)* (Makrolide/Linkosamide/Streptogramin B), *aacA-aphD*, *aphA3*, *aadD* und *spc* (Aminoglykoside oder Aminozyklitole), *fexA* (Phenicole), *dfkK* (Trimethoprim), sowie *vga(A)* und *vga(C)* (Pleuromutiline/Linkosamide/Streptogramin A) nachgewiesen. Bei keinem der Isolate konnten Gene für das Panton-Valentine-Leukozidin, Enterotoxine oder Exfoliativtoxine nachgewiesen werden. Die beiden Isolate von Menschen zeigten die gleichen phäno- und genotypischen Eigenschaften wie die Mastitis-Isolate des Betriebes.

Die bovinen Isolate ähnelten bereits beschriebenen MRSA-Isolaten von Schweinen und zeigten eine große Variabilität bezüglich ihrer Apal-Muster, sowie ihrer Resistenzphäno- und -genotypen.

FESSLER *et al.* 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother* 65:619-625.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Technische Universität Dresden; Alere Technologies GmbH, Jena

Identifizierung und Charakterisierung von methicillin-resistenten koagulase negativen Staphylokokken (KNS) aus Mastitisfällen von Kühen

In den letzten Jahren wurden verschiedene Studien zur Methicillinresistenz bei Staphylokokken von Tieren durchgeführt, die sich jedoch hauptsächlich mit *Staphylococcus aureus* bei Schweinen, Pferden, Hunden und Katzen beschäftigten. Im Vergleich dazu gibt es verhältnismäßig wenige Informationen zu MRSA bei Rindern und noch weniger zur Methicillinresistenz bei KNS aus bovinen Mastitisfällen.

In dieser Studie wurde die Korrelation von phäno- und genotypischen Tests hinsichtlich der Beurteilung der *mecA*-vermittelten Methicillinresistenz bei KNS aus Mastitisfällen von Kühen untersucht und die *mecA*-positiven Isolate genauer charakterisiert.

Insgesamt wurden 121 unverwandte KNS-Isolate aus Mastitisfällen von Kühen mittels Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin getestet. Beide Methoden der Empfindlichkeitsprüfung klassifizierten 16 Isolate als methicillinresistent und 96 Isolate als methicillinempfindlich. Das *mecA*-Gen konnte bei 15 der 16 resistenten Isolate nachgewiesen werden. Die verbleibenden neun KNS-Isolate erwiesen sich als *mecA*-negativ, zeigten aber minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) für Oxacillin von 0,5 oder 1 mg/L (= resistent) sowie Hemmhofdurchmesser von 18-28 mm (= empfindlich). Die *mecA*-positiven Isolate wurden einer *SCCmec*-Typisierung unterzogen. Hierbei ergab sich die Präsenz der *SCCmec*-Kassetten vom Typ V (5 *S. haemolyticus*) und Typ III (1 *S. saprophyticus*) bei Isolaten mit hohen Oxacillin-MHKs von ≥ 16 mg/L. *SCCmec*-Elemente vom Typ IV (5 *S. epidermidis*, 1 *S. capitis*) und Typ IV mit zusätzlichem *ccrA/B4*-Gen (2 *S. epidermidis*) sowie ein nicht-typisierbares *SCCmec*-Element (1 *S. epidermidis*) waren bei Isolaten mit niedrigen Oxacillin-MHKs von 1-4 mg/L zu finden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird empfohlen KNS mit Oxacillin-MHKs von 0,5 oder 1 mg/L vor der Klassifizierung als methicillinresistent auf das Vorliegen des *mecA*-Gens zu testen. Dieser Hinweis wird auch als Kommentar in das künftige CLSI-Dokument M31-A4 aufgenommen.

FESSLER *et al.* 2010. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother* 65:1576-1582.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Hochschule Furtwangen, Villingen-Schwenningen

Nachweis eines *erm(T)-dfkK-tet(L)*-Resistenzgenclusters bei MRSA ST398

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398-Isolate von Schweinen zeigen mit unterschiedlicher Häufigkeit Resistenz gegenüber Makroliden und Linkosamiden (ML). In früheren Untersuchungen wurden die Resistenzgene *erm(A)*, *erm(B)* und *erm(C)* – alleine oder in unterschiedlichen Kombinationen – nachgewiesen. Bei einem MRSA ST398-Isolat vom Schwein wurde keines der bislang bei Staphylokokken bekannten ML-Resistenzgene detektiert.

Untersuchungen zur Identifizierung des bei diesem porcinen MRSA ST398-Isolat vorhandenen ML-Resistenzgens umfassten zunächst Studien zur Plasmidlokalisierung. Protoplastentransformationsexperimente bestätigten, dass die ML-Resistenz von einem ca. 40 kb großen Plasmid vermittelt wurde. Dieses Plasmid mit der Bezeichnung pKKS25 vermittelte auch eine Resistenz gegenüber Trimethoprim

und Tetrazyklin über die Resistenzgene *dfrK* und *tet(L)*. Fragmente von pKKS25 wurden sequenziert und das rRNA Methylase-Gen *erm(T)* identifiziert. Eine Analyse der flankierenden Regionen von *erm(T)* ergab eine Identität zu der *erm(T)*-Region des Plasmids pRW35 von *Streptococcus pyogenes*. Diese Identität umfasste die Bereiche 123 bp stromaufwärts und 139 bp stromabwärts von *erm(T)*. Die konstitutive Expression des *erm(T)*-Gens von pKKS25 bestätigte sich in der Sequenz durch eine Deletion von 57 bp in der als Translationsattenuator bezeichneten *erm(T)*-Regulatorregion. Die Resistenzgene *dfrK* und *tet(L)* lagen stromabwärts von *erm(T)*. Die Region mit den drei Resistenzgenen wurde von neuen Insertionssequenzen flankiert, die die Bezeichnung *ISSau10* erhielten. *ISSau10* hat eine Größe von 793 bp und zeigt Sequenzidentitäten von 87% zu IS431 und 88% zu IS257.

Bisher wurde *erm(T)* bei Streptokokken und Laktobazillen beschrieben. Der Nachweis von *erm(T)* bei Staphylokokken weist auf einen Genaustausch zwischen diesen Bakterien und Staphylokokken hin. Die Lokalisation zwischen zwei IS-Elementen lässt auf die Mobilität dieser Resistenzgen-Region bestehend aus *erm(T)*, *dfrK* und *tet(L)* schließen.

KADLEC, K. UND S. SCHWARZ. 2010. Identification of a plasmid-borne resistance gene cluster comprising the resistance genes *erm(T)*, *dfrK*, and *tet(L)* in a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 54:915-918.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Analyse kleiner *vga(A)*- und *vga(C)*-tragender Plasmide von porcinen MRSA ST398 Isolaten

Das Resistenzgen *vga(C)* wurde auf dem Multiresistenzplasmid pKKS825 von einem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398-Isolat identifiziert. Wie *vga(A)* kodiert auch *vga(C)* für einen ABC Transporter, der Resistenz gegenüber Streptogramin A, Linkosamiden und Pleuromutilinen ($S_A/L/P$) vermittelt. Bei der Untersuchung porciner Staphylokokken aus Portugal wurden fünf MRSA ST398-Isolate identifiziert, die resistent gegenüber $S_A/L/P$ waren. Die Isolate wurden mittels PCR auf die Präsenz von *vga*-Genen untersucht, ihre *vga*-tragenden Plasmide in *S. aureus* RN4220 transferiert, vollständig sequenziert und analysiert.

Bei allen fünf Isolaten lag ein plasmidlokalisiertes *vga*-Gen vor. Die Plasmide vermittelten Resistenz gegenüber $S_A/L/P$. Vier der Isolate verfügten über das 5718 bp große Plasmid pCPS32, welches 99,9 % Sequenzidentität zu dem 5713 bp großen Plasmid pVGA von einem klinischen *S. aureus*-Isolat vom Menschen aufwies. Die Sequenzanalyse von Plasmid pCPS32 ergab die Präsenz von drei Leserahmen. Der erste kodiert für ein 312 Aminosäuren (AS) großes Replikationsprotein (Rep), der zweite für den 522 AS großen $S_A/L/P$ -Transporter *Vga(A)* und der dritte für ein 325 AS großes Mobilisierungsprotein (Mob). Das fünfte Isolat besaß das 5292 bp große Plasmid pCPS49, das ebenfalls drei Leserahmen (Rep, *Vga(C)*, Mob) aufwies. Das 220 AS große Rep

Protein zeigte 63,9 % Identität zu einem Plasmid-Replikationsprotein von *Lactococcus sakei*. Das 403 AS große Mob Protein wies 50,2 % Identität zu einem Mob Protein von *Lactococcus lactis* auf. Das 522 AS große *Vga(C)*-Protein war identisch mit der Sequenz des entsprechenden Proteins von pKKS825.

Der Nachweis eines weitgehend baugleichen *vga(A)*-tragenden Plasmids in Isolaten von Tieren und Menschen zeigt, dass solche kleinen Resistenzplasmide ausgetauscht werden können. Die Detektion des Gens *vga(C)* auf einem Plasmid, das Ähnlichkeiten zu Plasmiden von Laktokokken aufweist, deutet auf einen Austausch zwischen diesen verschiedenen Spezies.

KADLEC *et al.* 2010. Small plasmids carrying *vga(A)* or *vga(C)* genes mediate resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from swine. *J Antimicrob Chemother* 65:2692-2693.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Universidade Técnica de Lisboa (Portugal)

Molekulare Analyse von Methicillin-resistenten *Staphylococcus pseudintermedius*-Isolaten von Hunden und Katzen

Methicillin-resistente *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP)-Isolate werden häufig bei kleinen Haustieren nachgewiesen. Ziel dieser Studie war, MRSP-Isolate aus verschiedenen Ländern eingehend zu charakterisieren, um eine klonale Verbreitung nachzuweisen.

Insgesamt wurden 115 MRSP-Isolate von Hunden und Katzen untersucht. Die Isolate stammten aus verschiedenen europäischen Ländern sowie aus den USA und Kanada. Die Speziesidentifizierung erfolgte über RFLP-PCR. Die Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen wurde mittels Bouillon-Dilution oder Gradienten-Agardiffusion bestimmt. Resistenzgene wurden über einen Mikroarray detektiert. Die genetische Verwandtschaft der MRSP-Isolate wurde durch Multilocus Sequenz-Typisierung (MLST), Small-Makrorestriktionsanalyse mit anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und *spa*-Typisierung untersucht. Die *SCCmec*-Elemente, welche das Methicillin-Resistenzgen *mecA* tragen, wurden durch Multiplex-PCRs charakterisiert. Es wurden 14 verschiedene MLST-Typen, 22 PFGE-Typen und acht *spa*-Typen identifiziert. Ein Isolat war mittels PFGE nicht typisierbar. Der *SCCmec*-Typ II-III wurde am häufigsten nachgewiesen (n=86). Die übrigen Isolate wiesen *SCCmec* V (n=15), IV (n=6), VII (n=4) und III (n=2) auf oder waren nicht-typisierbar (n=2). Am häufigsten kamen die MRSP-Genotypen ST71 (MLST) - J (PFGE) - t02 (*spa*) - II-III (*SCCmec*) bei 67 Isolaten und ST68-C-t06-V bei 13 Isolaten vor. Die meisten Isolate zeigten auch Resistenz gegenüber Trimethoprim [*dfr(G)*], Gentamicin/Kanamycin [*aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*], Kanamycin [*aph(3')-III*], Streptomycin [*ant(6')-Ia*], Streptothricin [*sat4*], Makroliden und Linkosamiden [*erm(B)*, *Inu(A)*], Tetrazyklinen [*tet(M)*] und/oder

tet(K)], Chloramphenicol [*cat*_{PC221}] und Fluorochinolonen. Zwei klonale Linien wurden bei MRSP-Isolaten in Europa (ST71-J-t02-II-III) und in Nordamerika (ST68-C-t06-V) identifiziert. Zusätzlich wiesen alle MRSP-Isolate Resistenz gegenüber einer Vielzahl antimikrobieller Wirkstoffe auf. Diese antimikrobielle Multiresistenz stellt eine große therapeutische Herausforderung für die Behandlung von MRSP-Infektionen dar.

PERRETEEN *et al.* 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 65:1145-1154.

KADLEC *et al.* 2010. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. *J Antimicrob Chemother* 65:1826-1828.

Universität Bern (Schweiz); Friedrich-Loeffler-Institut, ING; National Veterinary Institute (SVA), Uppsala (Schweden); University of Copenhagen, Frederiksberg, (Dänemark); University of Tennessee, Knoxville, TN (USA); Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Rome (Italien); University of Utrecht (Niederlande); University of Guelph (Kanada); University of Edinburgh (UK)

Nachweis und Charakterisierung von funktionell inaktiven *mph(C)*-Genen bei Staphylokokken von freilebenden Nagern und Insektivoren

Makrolidresistenz bei Staphylokokken basiert auf einer Vielzahl unterschiedlicher Resistenzgene, deren Produkte entweder spezifische Adeninreste in der 23S rRNA methylieren, die Wirkstoffe aus der Bakterienzelle ausschleusen oder mittels Phosphorylierung inaktivieren.

Die Untersuchung von 655 unverwandten *Staphylococcus*-Isolaten von freilebenden Nagern und Insektivoren aus Polen identifizierte nur bei 12 Isolaten (1,8 %) Makrolidresistenz. Diese Isolate erwiesen sich als koagulasenegative Staphylokokken und verfügten über die Makrolidresistenzgene *erm(C)* (n=1), *msr(A)* (n=4), *mph(C)* (n=2), *msr(A)+mph(C)* (n=4) und *erm(C)+mph(C)* (n=1). Die Untersuchung phänotypisch makrolidempfindlicher Isolate mit MHK-Werten für Erythromycin von 0,25 mg/L zeigte, dass 22 Isolate, hauptsächlich *Staphylococcus lentus*, in der PCR positiv für das Gen *mph(C)* waren. Ein Vergleich der aus diesen *mph(C)*-Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit den Sequenzen nachweislich Makrolidresistenz vermittelnder *Mph(C)*-Varianten von Staphylokokken ergaben 89,7–91,6 % Identität. Weitere Vergleiche bestätigten, dass die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren (Ser24, Asp198, Val236) und solche, die das aktive Zentrum des *Mph(C)*-Proteins darstellen (Ser24, Val34, Val46, Arg48, Ser74, 90Tyr-ProLysLeu93, Asp198, 202GlyHis203, Met205, 216IleAsp217, Val236), auch bei diesen inaktiven *Mph(C)*-Varianten unverändert waren. In den Vergleichen der Aminosäuresequenzen ergaben sich aber Hinweise auf einzelne Aminosäuren, die ausschließlich bei funktionell aktiven *Mph(C)*-Varianten zu finden waren (Asn79 versus Lys79, Thr118 versus Pro118,

Lys119 versus Gln119, and Tyr233 versus His233). Inwiefern diese Aminosäureaustausche für die funktionelle Aktivität/Inaktivität eine Rolle spielen, bleibt zu klären.

Diese Studie zeigte, dass inaktive *mph(C)*-Gene bei koagulasenegativen Staphylokokken vorkommen, und deutet die Möglichkeit falsch positiver Testergebnisse an, sofern nur genotypische Tests (PCR, Mikroarray) verwendet werden. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Empfehlung genotypische Nachweise von Resistenzgenen mittels phänotypischer Tests zu bestätigen.

HAUSCHILD, T. AND S. SCHWARZ. 2010. Macrolide resistance in *Staphylococcus* spp. from free-living small mammals. *Vet Microbiol* 144:530-531.

University of Bialystok, Bialystok (Polen); Friedrich-Loeffler-Institut, ING

3 PARASITEN

3.1 TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii ist ein sich obligat intrazellulär vermehrender protozoärer Parasit, der alle warmblütigen Vertebraten einschließlich Säugetiere und Vögel infizieren kann. Die Menschheit ist bis zu einem Drittel mit *T. gondii* infiziert. Die meisten Primärinfektionen beim Menschen verlaufen asymptomatisch; manche Patienten erkranken an einer Lymphadenopathie oder einer okulären Toxoplasmose. Eine primäre, während der Schwangerschaft erworbene Infektion kann den Föten schwer schädigen. Bei immunsupprimierten Patienten kann eine Reaktivierung latenter Infektionen zu lebensbedrohlichen Enzephalitiden führen. Infektionen beim Menschen werden vor allem verursacht durch den Verzehr von rohem oder nicht ausreichend erhitztem Fleisch, das lebende Stadien von *T. gondii* enthält, oder durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln oder Wasser, kontaminiert mit Oozysten aus dem Kot infizierter Feliden. Die Populationsstruktur von *T. gondii* ist klonal. In Europa und Nordamerika herrschen die drei klonalen Typen I, II und III vor.

Nachweis und molekulare Typisierung von *T. gondii*

Verfahren zum serologischen Nachweis von *T. gondii*-Infektionen bei verschiedenen Tierarten (Schwein, Schaf, Ziege, Geflügel, Katze, Hund) wurden entwickelt, validiert und in epidemiologischen Untersuchungen angewendet. Verfahren zum DNA-Nachweis und zur Genotypisierung von *T. gondii* sind etabliert worden. Diese werden zur Charakterisierung aus *T. gondii*-infizierten Tieren gewonnener Isolate eingesetzt. Der in Deutschland vorherrschende Genotyp ist der klonale Typ II. Besondere Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit Humanerkrankungen verdienen aber *T. gondii*-

Stämme mit atypischen Genotypen, die Rekombinationen aus den in Nordamerika und Europa vorherrschenden klonalen *T. gondii*-Typen I, II und III darstellen, da diese in anderen Regionen der Welt mit bestimmten Manifestationsformen der humanen Toxoplasmose, insbesondere der okulären Toxoplasmose immunkompetenter Menschen assoziiert sind.

Im Rahmen von ausgedehnten Untersuchungen an Katzenkotproben in den Jahren 2004-2009 konnten solche durch sexuelle Rekombination in Deutschland entstandene *T. gondii*-Klone erstmals bei natürlich infizierten Katzen nachgewiesen werden. Da *T. gondii* mit atypischen Allelkombinationen auch über Importe aus anderen Ländern nach Deutschland eingeschleppt werden könnten, wurden in Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen aus Südamerika Untersuchungen zum Vorkommen von *T. gondii* durchgeführt und eine Reihe von südamerikanischen Isolaten molekular charakterisiert.

HERRMANN *et al.* 2010. Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. *Int J Parasitol* 40:285-292.

MORÉ *et al.* 2010. Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. *Vet Parasitol* 169:57-61.

SANTOS DE AZEVEDO *et al.* 2010. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Brazil Rev Parasitol Vet* 19:1-5.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; VetMed Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Ludwigsburg; Veterinärmedizinisches Labor Freiburg; Institut für medizinische Mikrobiologie, Georg-August-Universität, Göttingen (alle Deutschland); Universidad Nacional de La Plata; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (beide Argentinien); Universidade Federal de Campina Grande, Patos; Universidade de São Paulo (beide Brasilien)

3.2 NEOSPORA CANINUM

Die Neosporose zählt weltweit zu den am häufigsten diagnostizierten infektiösen Ursachen für bovine Aborte und Totgeburten. Man geht davon aus, dass sich die Mehrzahl der *Neospora caninum*-positiven Rinder pränatal bei der Mutter infiziert hat. Dieser vertikale Übertragungsweg ist sehr effizient und sichert *N. caninum* für mehrere Rindergenerationen das Überleben in einer einmal infizierten Zuchtlinie. Hunde und Kojoten sind Endwirte für den protozoären Infektionserreger. Endwirte scheiden im Kot Oozysten aus, die in der Umwelt längere Zeit überlebensfähig sind und wahrscheinlich über Kontaminationen des Futters oder des Trinkwassers zu Infektionen bei Zwischenwirten, wie zum Beispiel dem Rind führen.

Molekulare Typisierung

Verschiedene *N. caninum*-Isolate können unterschiedliche Virulenz-Eigenschaften besitzen. So werden neben *N. caninum*-

assozierten Abortgeschehen bei Rindern auch häufig asymptomatische vertikale Übertragungen des Parasiten beobachtet, die für das infizierte Kalb folgenlos bleiben. Es ist daher wichtig, *N. caninum*-Isolate mit möglichst großer Auflösung genetisch unterscheiden zu können. Methoden, die eine Mikrosatelliten-gestützte Typisierung des Erregers auch dann ermöglichen, wenn die Nukleinsäure des Parasiten in geringer Menge oder verunreinigt durch die Nukleinsäuren des infizierten Wirts vorliegt, wurden dazu eingesetzt, eine Typisierung solcher *N. caninum*-Feldstämme durchzuführen, die an seuchenhaften Abortgeschehen beteiligt waren. Bei der Untersuchung der abortierten Föten zeigte sich, dass es zwischen den Herden deutliche Unterschiede hinsichtlich der bei *N. caninum* nachweisbaren Mikrosatelliten-Muster gab. Die bei den abortierten Rinderföten einer jeden Herde nachgewiesenen *N. caninum* zeigten allerdings identische oder nahezu identische Mikrosatelliten-Muster. Dies deutet darauf hin, dass seuchenhafte Abortgeschehen auf eine von einer einzigen Quelle ausgehende Infektion der Herden zurückzuführen sind.

BASSO *et al.* 2010. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol* 173:24-31.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen; Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg; Landeslabor Berlin-Brandenburg Frankfurt (Oder) (alle Deutschland); Universität Zürich, Schweiz; Universidad Nacional de La Plata; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (alle Argentinien)

Bedeutung bestimmter Parasitenproteine für die Infektion und Diagnose

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurden *N. caninum*-Antigene zur Untersuchung ihrer Bedeutung während der Infektion von Wirtszellen eingesetzt. Ein Teil der untersuchten Antikörper reagierte mit einem Dichte-Granula-Antigen (GRA7), das sowohl in Tachyzoiten als auch von den Zystenstadien (Bradyzoiten) gebildet wird und Bedeutung für das Funktionieren der parasitophoren Vakuolen in Wirtszellen besitzt. Ein anderer Antikörper war gegen ein ausschließlich von Zystenstadien gebildetes Oberflächenantigen gerichtet. Nur die Antikörper gegen das Dichte-Granula-Antigen konnten *in vitro* die Invasion von Wirtszellen durch Tachyzoiten hemmen. Durch monoklonale Antikörper aufgereinigtes Parasitenantigen wurde dazu eingesetzt, die Infektion verschiedener Wirtstierspezies mit dem Parasiten spezifisch nachzuweisen.

AGUADO-MARTÍNEZ *et al.* 2010. Characterization of NcGRA7 and NcSAG4 proteins: immunolocalization and role in the host cell invasion by *Neospora caninum* tachyzoites. *Acta Parasitol* 55:304-311.

DAMRIYASA *et al.* 2010. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Bali cattle (*Bos javanicus*) from Bali, Indonesia. *Trop Anim Health Prod* 42:95-98.

HOSSEININEJAD *et al.* 2010. Development of an indirect ELISA test using an affinity purified surface antigen (P38) for sero-diagnosis

of canine *Neospora caninum* infection. *Vet Parasitol* 171:337-342.
SANTOS DE AZEVEDO *et al.* 2010. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Brazil Rev Parasitol Vet* 19:1-5.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Justus-Liebig-Universität, Gießen; (beide Deutschland); Universidad Complutense de Madrid (Spanien); Udayana University, Kampus Bukit Jimbaran, Bali (Indonesien); University of Shahrekord (Iran); Universidade Federal de Campina Grande, Patos; Universidade de São Paulo, São Paulo (beide Brasilien)

3.3 BESNOITIA BESNOITI

Besnoitiose ist eine protozoäre Erkrankung vor allem der Haut, der Unterhaut, der Schleimhäute, der Blutgefäße und anderer Körpergewebe. Besnoitiose kann bei chronisch infizierten Tieren zu Sklerodermie (verhärteter Haut), Hyperkeratose (übermäßiger Verhornung der Haut) und Alopezie (Haarausfall) führen. Die bovine Besnoitiose wird durch den Einzeller *Besnoitia besnoiti* verursacht und wurde erstmals im Jahr 2008 in Deutschland diagnostiziert. *Besnoitia besnoiti* vermehrt sich in vielen Körperzellen infizierter Tiere und bildet charakteristische, dickwandige Zysten, die mit Zystozoen gefüllt sind. Wirtschaftliche Verluste entstehen vor allem bei stark infizierten Tieren. Bei männlichen Rindern kann es zu vorübergehenden, aber auch zu dauerhaften Fruchtbarkeitsstörungen kommen. Es werden Leistungseinbußen durch eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens und in seltenen Fällen auch der Tod betroffener Rinder beobachtet. Befallene Rinder können eine Infektionsquelle für andere Rinder darstellen. Zurzeit ist keine Therapie bekannt, die zur vollständigen Eliminierung des Erregers führt. Es gibt auch keinen in Europa zugelassenen Impfstoff gegen Besnoitiose.

Nachweis von *B. besnoiti*

Im Jahr 2008 wurde erstmals bovine Besnoitiose in Deutschland diagnostiziert. Ein serologisches Nachweisverfahren, das in Deutschland zugelassen ist, stand zum Zeitpunkt des Ausbruchs noch nicht zur Verfügung. Daher wurden eine Reihe serologischer Referenzverfahren etabliert, um kommerzielle *B. besnoiti*-spezifische serologische Tests validieren zu können. Ziel ist es, im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen mit *B. besnoiti* infizierte Tiere zweifelsfrei nachweisen zu können.

ROSTAHER *et al.* 2010. Bovine besnoitiosis in Germany, *Vet Dermatol* 21:329-334.

MAJZOUB *et al.* 2010. Ein Ausbruch von Besnoitiose bei Rindern in Deutschland. *Wien Tierärztl Mschr* 97:9-15.

SCHARES *et al.* 2010. Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Vet Parasitol* 171:32-40.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Ludwig-Maximilians-Universität,

München (alle Deutschland); Universidad Nacional de La Plata; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (beide Argentinien); Universidade de Évora (Portugal); Animal Parasitic Diseases Laboratory, Animal and Natural Resources Institute, Beltsville, Maryland (USA); Prionics AG, Schlieren (Schweiz)

3.4 ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Infektionen von Menschen mit dem Larvenstadium des Kleinen Fuchsbandwurms *E. multilocularis* gelten in Mitteleuropa als die gefährlichste parasitär bedingte Zoonose. Die Alveoläre Echinokokkose (AE) ist seit dem 1. Januar 2001 nicht-namentlich meldepflichtig (Infektionsschutzgesetz). Infektionen bei Tieren mit *Echinococcus spp.* sind seit 9. November 2004 (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten) meldepflichtig. Der Parasit hat einen obligaten Wirtswechselzyklus. Infizierte Endwirte (Canidae, auch Felidae; in Europa vor allem der Fuchs) beherbergen wenige bis zu mehreren 100.000 geschlechtsreife, 1-3 mm kleinen Bandwürmer im Dünndarm und scheiden die auch für den Menschen infektiösen Eier mit der Losung aus. Diese bleibt über Monate an der bodennah wachsenden Vegetation infektiös. Natürliche Zwischenwirte sind Nager, die sich durch orale Aufnahme der Eier infizieren und das Larvenstadium in nahezu allen Fällen in der Leber beherbergen. Der Lebenszyklus schließt sich über die Räuber-Beute-Beziehung der End- und Zwischenwirte. Der Mensch infiziert sich als Fehl-Zwischenwirt.

Räumlich-zeitliche Analysen zur Epidemiologie des Kleinen Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*

Erst seit etwa 15 Jahren ist bekannt, dass der Kleine Fuchsbandwurm bundesweit bei Füchsen vorkommt. Hinweise auf eine deutliche Zunahme von infizierten Füchsen (absolut und/oder relativ) verdichten sich seit einigen Jahren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies zu einem erhöhten Infektionsrisiko bei Menschen führt, das jedoch aufgrund der langen Inkubationszeit (5 – 15 Jahre) erst mit jahrelanger Zeitverzögerung zu einem Anstieg der Erkrankungszahlen führen würde. Eine möglichst genaue Kenntnis der zeitlichen und räumlichen Dynamik dieser Parasitose im natürlichen Lebensraum sowie der sie beeinflussenden Faktoren stellen Grundlagen für räumliche und zeitliche Risikobewertungen einschließlich Prüfung von Präventions- und Interventionsstrategien dar. Ein neuer Aspekt ist die Zuwanderung und Etablierung einer neuen Endwirtpopulation, bestehend aus dem Marderhund, im Osten Deutschlands. Epidemiologische Analysen bei so heterogen verteilten Infektionen in Wildtierpopulationen, insbesondere bei Wirtswechselzyklen, sind epidemiologisches Neuland. Daher ist dies auch ein Modellprojekt über die Erreger-orientierte Fragestellung hinaus. Zur Bearbeitung dieser Aufgabe muss

eine geeignete Datenbasis (Datum und digitalisierter Ort der Streckung, diagnostischer Befund, andere epidemiologisch relevante Informationen, Stichprobendichte) geschaffen und über längere Zeiträume fortgeschrieben werden. Eigene Untersuchungen gestreckter Füchse, zunehmend auch Marderhunde (Einsendungen durch Unterstützung aus verschiedenen anderen Projekten) bilden den belastbaren Daten-Kernbereich, daneben wurden in Kooperation auch andere Datenbasen für dieses Projekt nutzbar gemacht und eingebunden. Das schließt auch die Evaluierung und Harmonisierung der diagnostischen Methoden ein sowie die Prüfung, ob mit im Freiland gesammelten Lösungsproben die regionale epidemiologische Situation überwacht werden kann. Zur Verarbeitung dieser Daten wurden neue epidemiologische Analysekonzepte, auch unter Einbeziehung Geographischer Informationssysteme, entwickelt und evaluiert.

Peters *et al.* 2010. Alveolar echinococcosis in a captive red-necked wallaby (*Macropus rufogriseus*). Berl Münch Tierärztl Wochenschr 123:63-69

Schwarz *et al.* 2011. Estimated prevalence of *Echinococcus multilocularis* in raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in northern Brandenburg, Germany. Current Zoology 57 (online).

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg, Tierärztliche Hochschule Hannover (alle Deutschland)

wurde erstmals 1990 in einer britischen Hauskatze diagnostiziert. Der erste FSE-Fall in Deutschland wurde im Jahre 2007 bei einem 9-jährigen weiblichen Gepard aus dem Tiergarten Nürnberg festgestellt, der in den Niederlanden geboren wurde. Mittels Immunoblot und immun-histochemischer Untersuchungen konnten PrP^{Sc}-Ablagerungen in peripheren Nerven, im lymphoretikulären System und im Muskelgewebe sowie erstmals in der Niere des erkrankten Tieres detektiert werden. Die weit verbreiteten Ablagerungen lassen daher auf eine simultane neuronale, lymphatische und hämatogene Ausbreitung des FSE-Erregers schließen. In einer weiteren *In-vitro*-Analyse konnte erstmals FSE mittels PMCA (protein misfolding cyclic amplification) in bovinem Hirnhomogenat amplifiziert werden. Die weiteren biochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen belegen die große Ähnlichkeit zwischen dem FSE- und dem BSE-Erreger und bestätigen frühere Hinweise, dass FSE auf die Infektion von Katzen mit dem BSE-Erreger zurückgeht.

EIDEN *et al.* 2010. Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah. J Gen Virol 91:2874-83.

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT, Insel Riems, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen; Tiergarten Nürnberg

4 PRIONKRANKHEITEN

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSEs), auch Prionkrankheiten genannt, sind fatale neurologische Erkrankungen, die Scrapie bei kleinen Wiederkäuern, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) beim Menschen einschließen. Gemäß der von S. Prusiner aufgestellten „Protein-only“-Hypothese werden Prionkrankheiten allein durch die Konformationsänderung eines zellulären körpereigenen Prion-Proteins (PrP^C) in eine abnorme Isoform (PrP^{Sc}) verursacht.

Für die Erforschung der TSE-Erkrankungen stehen verschiedene diagnostische Nachweismethoden und ein breites Spektrum an Untersuchungssystemen zur Verfügung. Diese reichen von Infektionsstudien am Tier, Verwendung transgener Mauslinien über Zellkultur bis hin zu Studien in zellfreien Systemen. Damit konnten u. a. europäische TSE-Isolate charakterisiert und deren Übertragbarkeit auf verschiedene Spezies analysiert werden.

Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) können auch bei Katzen als Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) auftreten. FSE wurde sowohl bei Haus- als auch bei Wildkatzen in zoologischen Gärten beobachtet. Diese Erkrankung trat vor allem im Vereinigten Königreich auf und

Die klassische Scrapie in Europa wird durch verschiedene Scrapiestämme ausgelöst

Die pathomorphologische und pathohistologische Varianz der in Europa festgestellten klassischen Scrapiefälle wurde in der Vergangenheit meist den unterschiedlichen PrP-Genotypen der betroffenen Schafe zugeordnet. Um die Frage zu beantworten, wie groß der Einfluss des Wirts-PrP-Gens auf die Ausprägung des Phänotyps tatsächlich ist, wurden 23 Scrapie-Isolate aus fünf EU-Mitgliedsstaaten mittels immunhistochemischer (IHC) Untersuchung und Western Blot untersucht. Alle 23 betroffenen Schafe trugen den Genotyp PrP^{ARQ/ARQ}. Nach den Ergebnissen der IHC konnten die Fälle in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die nicht im Zusammenhang mit der geografischen Herkunft stand. Die nach der histopathologischen Untersuchung erstellten Läsionsprofile wiesen große individuelle Unterschiede auf und konnten daher nur begrenzt zur Stammdifferenzierung herangezogen werden. Die Western Blot-Analyse ergab zudem eine Ähnlichkeit eines Falles mit dem etablierten „TSE-Laborstamm“ CH1641. Aus den Ergebnissen dieser Studie kann geschlossen werden, dass in Europa tatsächlich eine Reihe unterschiedlicher Scrapiestämme existieren.

GONZÁLEZ *et al.* 2010. Variability in disease phenotypes within a single PRNP genotype suggests the existence of multiple natural sheep scrapie strains within Europe. J Gen Virol [Epub ahead of print; doi:10.1099/vir.0.022574-0].

Veterinary Laboratories Agency (VLA), Penicuik und Weybridge (UK); Universidad de Zaragoza (Spanien); Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (IZS), Tori-

no (Italien); Central Veterinary Institute, Lelystad (Niederlande); Friedrich-Loeffler-Institut, INNT

Polymorphismen in Genen außerhalb des PrP-Gens sind nicht mit Scrapie-Empfänglichkeit in Schafen korreliert

In dieser Studie wurden die Gene für *Cathepsin B*, *Cathepsin D*, *Calpain*, *Large Polypeptide L2*, *Kalikrein* und den *Transforming Growth Factor beta 1* von 72 atypischer und 104 klassischer Scrapie-Fälle sowie von 443 klinisch unauffälligen Herdenmitgliedern sequenziert. Der Vergleich der Sequenzen zeigte keinen Zusammenhang zwischen Mutationen in den genannten Genen und einer erhöhten oder erniedrigten Scrapie-Empfänglichkeit.

CASPARI *et al.* 2010. Polymorphisms in genes CTSB, CTSD, CAPN2, KLK1 and TGFB1 not associated with susceptibility to atypical or classical ovine scrapie. *Archiv Tierzucht* 4:457-464.

Department of Animal Breeding and Genetics, Justus-Liebig Universität Gießen; Friedrich-Loeffler-Institut, INNT

Charakterisierung atypischer Scrapie-Fälle in Europa

Neben der klassischen Scrapie wurden atypische Scrapie-fälle beschrieben, die vorwiegend Einzeltiere betreffen, deren Genotyp eine geringe Empfänglichkeit gegenüber klassischer Scrapie aufweist. Im Rahmen der Umsetzung des aktiven TSE-Überwachungsprogramms bei kleinen Wiederkäuern in der EU wurden 2010 die ersten beiden Fälle von atypischer Scrapie in Polen diagnostiziert. Beide Tiere gehörten in die sog. TSE-Risikogruppe, d. h. sie stammten aus den Tieren, die tot zur Tierkörperbeseitigung angeliefert worden waren. Bei der stichprobenartigen Schnelltestuntersuchung wurden sie auffällig; die Bestätigungsuntersuchung mittels Western Blot ergab den Befund atypische Scrapie. Die Tiere trugen die Genotypen PrP^{ALRQ/ALHQ} und PrP^{ALRQ/ALRR}, für die bereits zuvor eine Assoziation mit atypischer Scrapie beschrieben worden war. Wie in fast allen Fällen von atypischer Scrapie wies auch bei diesen beiden Tieren das Kleinhirn die stärksten PrP^{Sc}-Ablagerungen auf.

In einer weiteren Studie wurden atypische Scrapie-Fälle aus Großbritannien mit Fällen aus verschiedenen EU- und Nicht-EU-Mitgliedsstaaten verglichen. Zu diesem Zweck wurden diese Fälle auf zwei transgene Mauslinien übertragen, die das Prion-Protein des Schafes entweder mit VRQ-Allel (tg338 Mäuse) oder mit dem ARQ-Allel (tgshpXI Mäuse) überexprimieren. Nicht-transgene Wildtyp-Mäuse konnten wie bereits für atypische Scrapie-Isolate aus Frankreich und Deutschland beschrieben, nicht infiziert werden. Die Gehirne der erkrankten transgenen Mäuse wurden mittels Immunoblot und immunhistochemisch untersucht. Die Verteilung der PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn sowie das ermittelte PrP-Bandenprofil entsprachen den Mustern bei atypischer Scrapie aus anderen EU-Mitgliedsstaaten. Daraus kann geschlossen werden, dass es bisher nur einen Stamm von atypischer Scrapie gibt.

POLAK *et al.* 2010. Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. *Vet J* 186:47-52.

GRIFFITHS *et al.* 2010. Characterisation of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol* 91:2132-2138.

National Veterinary Research Institute, Pulawy (Polen); Central Veterinary Institute Lelystad (Niederlande); Veterinary Laboratories Agency, Addlestone, (UK); Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas (Frankreich); Friedrich-Loeffler-Institut, INNT

Nachweis von Infektiosität in der Zunge und der nasalen Mucosa von terminal an BSE erkrankten Rindern ohne biochemischen Nachweis von PrP^{Sc}

In früheren Studien konnte mit Hilfe von Bioassays in hochsensitiven bovines PrP-exprimierenden transgenen Mäusen gezeigt werden, dass der Erreger bei BSE-infizierten Rindern bis zum Ausbruch klinischer Symptome auf das zentrale und periphere Nervensystem beschränkt bleibt, während das lymphatische System frei vom BSE-Erregern ist. In der vorliegenden Studie wurden Proben aus der Zungenmuskulatur und aus der Nasenschleimhaut von experimentell BSE-infizierten Rindern in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung mittels hochsensitiver biochemischer Nachweismethoden und mittels Maus-Bioassay untersucht. Es stellte sich heraus, dass es gegen Ende der Inkubationszeit, also bereits nach dem Auftreten der ersten klinischen Anzeichen einer BSE-Infektion, zu einer zentrifugalen Ausbreitung des Erregers vom zentralen Nervensystem in die Peripherie kommt. Da die beiden genannten Proben (Zungenmuskulatur und Nasenschleimhaut) über die Hirnnerven anatomisch in direkter Verbindung zum Gehirn stehen, ist es leicht nachvollziehbar, dass in diesen Proben der Erreger mittels Maus-Bioassay nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise ergaben alle biochemischen Untersuchungen dieser Proben negative Ergebnisse, was den direkten und proportionalen Zusammenhang zwischen dem PrP^{Sc}-Gehalt eines Gewebes und dessen Erreger-Gehalt in Frage stellt. Bei allen untersuchten präklinischen Tieren verliefen die Maus-Bioassays mit negativem Ergebnis.

BALKEMA-BUSCHMANN *et al.* 2010. BSE infectivity in the absence of detectable PrP^{Sc} accumulation in the tongue and nasal mucosa of terminally diseased cattle. *J Gen Virol* [Epub ahead of print; doi:10.1099/vir.0.025387-0]

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT

Subtypen des humanen zellulären Prion-Proteins sind mit unterschiedlicher Löslichkeit assoziiert

Das wirtseigene zelluläre Prion-Protein bildet in den verschiedenen Geweben und Hirnregionen unterschiedliche Subtypen aus, die unterschiedlich glykosyliert sind und sich anhand ihrer Löslichkeit differenzieren lassen. In dieser Studie wurde daher systematisch der Einfluss unterschiedlicher Detergentien (anionisch, apolar und zwitterionisch) auf die Löslichkeit untersucht. Dabei konnten unterschiedliche Va-

rianten des PrP^C aus Hirnextrakten isoliert werden, die sich in leicht und schwer lösliche Fraktionen auftrennen. Die unterschiedliche Löslichkeit beruht dabei vermutlich auf den unterschiedlichen Glykosylierungsmustern, d. h. dem Verhältnis der nicht-, einfach- und zweifach-glykosylierten PrP^C, das auch die Struktur des Proteins beeinflusst. Ob diese unterschiedlichen Isoformen auch für die Entstehung unterschiedlicher TSE-Stämme verantwortlich sein können, soll in weiteren Studien geklärt werden.

Kuczius *et al.* 2010. Subtyping of human cellular prion proteins and their differential solubility. *Exp Neurol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.expneurol.2010.10.014]

Westfälische Wilhelms-University, Münster; Friedrich-Loeffler-Institut, INNT

Antiprion-Aktivität von Tocopherol-Derivaten basiert nicht auf antioxidativem Mechanismus

Die vorteilhaften Effekte von Tocopherolen (Vitamin E) bei degenerativen Hirnveränderungen wurden bisher überwiegend dem antioxidativen Effekt zugeschrieben. Nicht-antioxidative Effekte von Tocopherolen werden durch die Inhibierung des Protein Kinase C (PKC) signaling vermittelt. Prion-Erkrankungen als Paradigma für Proteinfehlfaltungs-Erkrankungen sind durch die induzierte Konversion des normalen zellulären Wirtsproteins PrP^C in die pathologische Isoform PrP^{Sc} charakterisiert. Die molekulare Regulation der Umfaltung und damit der Replikation des PrP^{Sc} ist nur wenig verstanden. Wir konnten zeigen, dass Tocopherole die Prion-Replikation durch einen anderen Mechanismus als durch antioxidative Aktivität verhindern. Tocopherol-Succinat, nicht aber ein ebenfalls antiprion-wirksamer aktiver PKC Inhibitor, konnte partiell durch Rapamycin antagonisiert werden, was darauf schließen lässt, dass ein Weg über das „mammalian target of rapamycin (mTOR)“ mit den biologischen Effekten des Tocopherols interferiert. Eine Interaktion mit dem mTOR-Weg wurde bisher für Tocopherol nicht beschrieben, könnte jedoch auch für andere pathophysiologische Prozesse außer bei der Prionvermehrung von Bedeutung sein.

MUYRERS *et al.* 2010. Structure-activity relationship of tocopherol derivatives suggesting a novel non-antioxidant mechanism in antiprion potency. *Neurosci Lett* 469:122-126.

Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; Friedrich-Loeffler-Institut, Ifl

Prion-Protein-„silencing“ verstärkt eine zentralnervöse Autoimmunerkrankung durch T-Zell-Rezeptor Signalwege

Die biologische Funktion des endogenen zellulären Prion-Proteins ist noch immer nicht eindeutig geklärt. Aus diesem Grunde wurde die biologische Funktion bei der Generierung einer zellulären Immunantwort untersucht, wobei für das zelluläre Prion-Protein spezifische siRNA (small interfering

ribonucleic acid) *in vivo* und *in vitro* zum Einsatz kam. Dieser „silencing“-Mechanismus wurde durch die Verwendung von monovalenten Antikörpern, die das zelluläre Prion-Protein blockieren, sowie durch die Verwendung Prion-Protein-defizienter und -transgener Mäuse bestätigt. Die Effekte des siRNA-„silencing“ *in vivo* waren zeitlich begrenzt, auf sekundäre lymphoide Organe beschränkt und resultierten in einer ca. 70 % Reduktion der Expression des zellulären Prion-Proteins in Leukozyten. Eine Blockierung des Signalweges des zellulären Prion-Proteins verstärkt die Antigen-spezifische Aktivierung und Proliferation und erhöht das T-Zell-Rezeptor signalling, das wiederum zur Phosphorylierung des zeta-Kette assoziierten Protein-70 und zur transkriptionellen Aktivierung des Nukleären Faktors des T-Zell-Aktivator Proteins 1 führt. Eine *In-vivo*-Behandlung mit Prion-Protein-Gen-siRNA fördert die T-Zelldifferenzierung des pro-inflammatorischen Phänotyps und erhöht das Überleben von Antigen-spezifischen T-Zellen. Das „silencing“ des zellulären Prion-Proteins mittels siRNA resultierte auch in einer stärkeren Ausprägung einer aktiv induzierten oder adoptiv transferierten experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE). Die Behandlung von basischem Myelin Protein (MBP)-T-Zell-Rezeptor transgenen Mäusen mit siRNA führte schließlich zum Auftreten einer spontanen EAE. Diese Ergebnisse zeigen, dass diese Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems in allen Stadien der Erkrankungen moduliert wird. Dies trifft für die Generierung der T-Zell-Effektor Phase ebenso zu wie für die Auslösung der T-Zell-Effektorfunktion und die Dauer der zellulären Immunantwort. Diese Arbeiten deuten darauf hin, dass das zelluläre Prion-Protein die T-Zell-Rezeptor-vermittelte T-Zell-Aktivierung und Differenzierung sowie das Überleben der Zellen reguliert. Das zelluläre Prion-Protein stellt sich als ein Regulator der zellulären immunologischen Homeostase dar und bietet somit möglicherweise einen Zielmechanismus für eine therapeutische Immunmodulation.

Hu *et al.* 2010. Pharmacological prion protein silencing accelerates central nervous system autoimmune disease via T cell receptor signalling. *Brain* 133:375-388.

University of Texas, Dallas; University of Pittsburgh; Ohio State University Columbus (alle USA); Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; Technische Universität München; Universität Göttingen; Friedrich-Loeffler-Institut, Ifl (alle Deutschland).

5 IMMUNOLOGIE

Die Arbeiten zu immunologischen Themen am Friedrich-Loeffler-Institut fassen sowohl grundlegende Fragen zur Erkennung von Fremdanigenen und der Regulation der Immunantwort als auch Möglichkeiten von Immuninterventionen bei Säugetieren. Daneben findet die Erforschung des Immunsystems und der Effektormechanismen bei Fischen zunehmende Beachtung.

5.1 IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN

Funktion von Proproteinkonvertasen bei der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation

In der antiviralen Immunantwort von Nutztieren und Menschen spielt die MHC I-vermittelte Antigenpräsentation eine entscheidende Rolle. Von Viren stammende Peptidantigene werden von membranständigen MHC I-Molekülen innerhalb infizierter Zellen spezifisch gebunden und zur Zelloberfläche transportiert. Hierzu werden vom Proteasom hergestellte Peptidantigene über den Peptidtransporter TAP in das Endoplasmatische Retikulum (ER) überführt, wo die Beladung von MHC I-Molekülen erfolgt. Diese MHC I-Moleküle verlassen das ER und werden nach Erreichen der Zelloberfläche zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Die MHC I-Präsentierung eines viralen Antigens aktiviert das Immunsystem und führt zur Eliminierung infizierter Zellen. Da die Antigenpräsentation essentieller Bestandteil der zellulären Immunantwort ist, scheint es nicht verwunderlich, dass Viren zahlreiche Evasionsstrategien besitzen, welche die Funktion der MHC I-Moleküle unterlaufen. So bewirken virale Angriffe auf die TAP-abhängige Antigenpräsentation eine gestörte MHC I-Beladung im ER. Studien unseres Labors zeigen jedoch, dass in einer Situation, bei der die MHC I-Beladung über TAP beeinträchtigt ist, MHC I-Moleküle während ihres zellulären Exports über die Aktivität von Proproteinkonvertasen (pPCs) weiterhin mit geeigneten Peptidantigenen versorgt werden können. Bei den pPCs handelt es sich um zelleigene Serinproteasen, die sich in Zellstrukturen finden, welche von MHC I-Molekülen unmittelbar vor Erreichen der Zelloberflächen passiert werden. Unter Verwendung spezifischer siRNA-Methoden und massenspektrometrischer Peptidanalysen konnten wir erstmalig nachweisen, dass unter den bisher bekannten pPCs das PC7-Enzym, welches nachweislich in Immunzellen exprimiert wird, eine entscheidende Rolle bei der Peptidversorgung der MHC I-Moleküle spielt. Da virale Vermehrungsstrategien häufig auf die proteolytische Aktivität von pPCs angewiesen sind, scheint dieser zusätzliche TAP-unabhängige Weg der MHC I-Beladung eine wichtige zelluläre Offensive gegen virale Subversionsmechanismen darzustellen und liefert neue Einblicke in die antivirale Immunantwort.

LEONHARDT *et al.* 2010. Post-ER rescue of unstable MHC class I requires proprotein convertase PC7. *J Immunol* 184:2985-2998

Yale University School of Medicine, New Haven (USA); Friedrich-Loeffler-Institut, IfI und IMB

Koevolution von Immunrezeptoren des Wirtes und Adhäsionsfaktoren der Pathogene

Für die Feinregulation einer Immunantwort sind Immunrezeptorfamilien unerlässlich. Überraschenderweise unterliegen die Genfamilien, die für die Mitglieder dieser Immunre-

zeptoren kodieren, einer außerordentlich raschen Evolution. Dies führt dazu, dass sich diese Genfamilien zwischen verschiedenen Spezies stark unterscheiden. Eine dieser Familien ist die Karzinoembryonale Antigen-(CEA)-Familie. Um den evolutionären Druck, der die CEA Genfamilien modelliert, zu erkennen, haben wir die CEA Genfamilie in 27 verschiedenen Säugerspezies analysiert. Unsere phylogenetischen Untersuchungen legen nahe, dass die ursprüngliche CEA Familie der Säuger aus fünf Genen bestand. Eines dieser Gene kodiert für den inhibierenden Immunrezeptor CEACAM1. Durch unterschiedlich stark ausgeprägte Spezies-spezifische Genmultiplikation des ursprünglichen CEACAM1 Genes variiert die Größe der CEA Genfamilie von weniger als fünf Genen in den Hasenartigen (Lagomorpha) bis zu über hundert Genen in Fledermäusen. Analysen der Substitutionsraten innerhalb der Nukleotidsequenz der Ligandenbindungsdomäne von CEACAM1 zeigten, dass eine Selektion auf Diversifizierung auf dieser Domäne liegt. Wir fanden deutliche Hinweise, dass dieser Selektionsdruck durch verschiedene virale und bakterielle Pathogene verursacht wird, die CEACAM1 als zellulären Rezeptor benutzen. In der Tat fanden wir in den meisten Säugerspezies Rezeptoren, die über aktivierende Signalmotive verfügen und deren Ligandenbindungsdomänen sehr ähnlich zu der des inhibierenden CEACAM1 sind. Das humane CEACAM3 ist eines dieser Proteine, welches als *decoy receptor* für CEACAM1 in Granulozyten fungieren kann, indem es die Aufnahme und Zerstörung von spezifischen Bakterien durch sein aktivierendes Signalmotiv ermöglicht. Die schnelle Diversifizierung der Ligandenbindungsdomäne von CEACAM1 in verschiedenen Säugerspezies impliziert, dass Pathogene, die CEACAM1 als zellulären Rezeptor verwenden, eine gewisse Speziespezifität aufweisen. Mit Hilfe von GFP-markierten löslichen aminoterminalen Domänen von CEACAM1 konnten wir bestätigen, dass human-spezifische bakterielle Pathogene selektiv an humanes, aber nicht an CEACAM1 Orthologe anderer Spezies binden. Diese Untersuchungen legen eine Koevolution von mikrobiellen Adhäsinen und ihren korrespondierenden zellulären Rezeptoren nahe und bilden so die Grundlage für die Entwicklung neuartiger prophylaktischer bzw. therapeutischer Strategien zur Behandlung von Infektionskrankheiten.

KAMMERER, R. UND W. ZIMMERMANN. 2010. Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen (CEA) families. *BMC Biology* 8:12

VOGES *et al.* 2010. CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species specific. *BMC Microbiol* 10:117

Friedrich-Loeffler-Institut, IfI; Ludwig-Maximilians-Universität München; Universität Konstanz (alle Deutschland); Tel Aviv University (Israel).

Funktion des koinhibierenden Immunrezeptors CEACAM1 in Zellen außerhalb des Immunsystems

Koregulatorische Immunrezeptoren können Immunsystem-spezifisch exprimiert werden, sie können aber auch

zusätzlich von Zellen exprimiert werden, die keine immunologische Funktion ausüben. Die Funktion dieser Immunrezeptoren in Nicht-Immunzellen ist von besonderem Interesse, da sich daraus mögliche Nebenwirkungen von therapeutischen Maßnahmen ablesen lassen, die auf die Beeinflussung dieser Immunrezeptoren, zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder zur Aktivierung des Immunsystems abzielen. Des Weiteren erleichtern Untersuchungen in Nicht-Immunzellen häufig die Entschlüsselung von Signaltransduktionsketten, die durch diese Immunrezeptoren ausgelöst werden. Das CEACAM1 ist ein typisches Beispiel eines koregulatorischen Immunrezeptors, der auf verschiedenen Nicht-Immunzellen exprimiert wird. CEACAM1 kommt in zwei Hauptisoformen vor, die sich durch die An- bzw. Abwesenheit eines Tyrosin-basierten inhibierenden Signalmotivs (ITIM) im zytoplasmatischen Teil unterscheiden. Wir fanden, dass die Signaltransduktion durch CEACAM1 in Epithelzellen, auf eine ITIM-abhängige Weise, zu einer Kontaktinhibition und dadurch zur Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung führt. Unterbrechung dieser ITIM-vermittelten Signaltransduktion durch Überexpression von ITIM-defizientem CEACAM1 oder anderen CEACAMs wie CEACAM5 oder CEACAM6 führt zu einer Zelldifferenzierung und zum bösartigen Zellwachstum. In Endothelzellen beeinflusst die CEACAM1-vermittelte Signaltransduktion, auf vergleichbare Weise, die vaskuläre Integrität. Die Abwesenheit von CEACAM1 in murinen Endothelzellen erhöht die basale Gefäßpermeabilität, die durch eine erhöhte Proteinkinase B (PKB/Akt) und endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase Aktivität hervorgerufen wird. Diese Untersuchungen zeigen, dass CEACAM1 außerhalb des Immunsystems für die Gewebshomöostase von großer Bedeutung ist. Singer et al. 2010. Deregulation of the CEACAM Expression Pattern Causes Undifferentiated Cell Growth in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *PLoS ONE* 5:e8747.

Nouvion et al. 2010. CEACAM1: a key regulator of vascular permeability. *J Cell Sci* 123:4221-4230

Institut für Anatomie, Universität Essen; Medizinische Klinik, Charité-Universitätsmedizin Berlin; Friedrich-Loeffler-Institut, IfI (alle Deutschland); McGill University, Montreal; Université de Montreal, Montreal; (beide Kanada).

Der alternative NF- κ B Signalweg wird für eine effektive Immunantwort gegen das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus benötigt

Bei der Regulation der Immunantwort sind zwei NF- κ B Signalwege beteiligt. Der klassische NF- κ B Weg ist für die Aktivierung von Genen verantwortlich, die bei der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Im Gegensatz hierzu steuert der alternative NF- κ B Signalweg Prozesse der adaptiven Immunantwort.

Um die Rolle des NF- κ B Signalweges bei der Kontrolle einer viralen Infektion näher zu untersuchen, haben wir Mäuse

mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) infiziert. Dies ist ein ausgezeichnetes Modell zur Untersuchung der Immunantwort nach viraler Infektion. Durch die Verwendung von Mäusen, die entweder einen Defekt im klassischen NF- κ B Weg (p50^{-/-} Mäuse) oder im alternativen Weg (p52^{-/-} Mäuse) besitzen, konnten wir zeigen, dass der alternative NF- κ B Signalweg für eine effektive Immunantwort gegen LCMV benötigt wird. Mäuse, die einen Defekt im alternativen NF- κ B Signalweg haben, zeigten eine verminderte adaptive Immunantwort gegen eine LCMV Infektion und eine verminderte humorale Immunantwort gegen eine Infektion mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). Adoptive Transfer Experimente zeigten, dass vermindertes "Priming", aber nicht ein Defekt in der T-Zelle für die verminderte Immunantwort gegen LCMV bzw. VSV verantwortlich ist. Unsere Daten verdeutlichen, dass ein funktioneller NF- κ B Signalweg für eine effektive Immunantwort gegen virale Infektionen benötigt wird.

DROEBNER et al. 2010 The Alternative NF- κ B signalling pathway is a prerequisite for an appropriate immune response against Lymphocytic Choriomeningitis Virus infection. *Viral Immunology* 23, 295-308

Friedrich-Loeffler-Institut, IfI; Technische Universität München

5.2 ALLGEMEINE IMPFSTOFFENTWICKLUNG UND IMMUN-THERAPIE

Aktive Immunisierung gegen Selbstantigene

Die aktive Immunisierung gegen Selbstantigen stellt eine besondere Herausforderung der Impfstoffentwicklung dar, da hier eine effektive Immunität ohne Induktion einer zerstörenden Autoimmunität erreicht werden muss. Diese Art der Immunisierung spielt heute eine wichtige Rolle bei der Immuntherapie von Tumorerkrankungen, kann aber auch wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Behandlung von Autoimmun- bzw. Infektionskrankheiten liefern.

Wir haben nun mit Hilfe eines transgenen autochthonen Magenkarzinommodells die Effektivität einer gegen ein Selbstantigen gerichteten Antitumorimmunreaktion untersucht. Wir konnten feststellen, dass eine gegen das Zielantigen gerichtete T-Zellimmunität zwar in der Lage war, subkutan wachsende Magenkarzinomzellen, nicht jedoch den autochthon wachsenden Tumor zu eliminieren. Histologisch war eine mangelhafte Infiltration der autochthonen Tumoren durch die Selbstantigen-spezifischen T-Zellen zu beobachten. Diese Untersuchungen legen nahe, dass in Magenkarzinompatienten die Penetration der Tumorantigen-spezifischen T-Zellen nicht ausreicht, um die Tumorprogression zu kontrollieren, ohne dass zusätzliche therapeutische Strategien angewandt werden, die zum Ziel haben die Tu-

mormikroumgebung im Sinne einer besseren T-Zellpenetration zu verändern.

BOURQUIN *et al.* 2010. Eradication of subcutaneous but not of autochthonous gastric tumors by adoptive T cell transfer in an SV40 T antigen mouse model. *J Immunol* 185:2580-2588

Ludwig-Maximilians-Universität München; Friedrich-Loeffler-Institut, IfI

Lösliches CD70 als neues immuntherapeutisches Agens für das experimentelle Glioblastom

Der geringe Erfolg von Behandlungsstrategien beim malignen Glioblastom hat dazu geführt, dass in den vergangenen zwei Dekaden die Immuntherapie als ein aussichtsreicher experimenteller Weg zu einer Gliombehandlung gesehen wurde. Ein mögliches Molekül für eine solche Immuntherapie ist das auf der Zelloberfläche von Gliomzellen vorhandene CD70, das eine potente anti-Tumor Immunantwort über die Aktivierung des kostimulatorischen Rezeptors CD27 auf Immuneffektorzellen induzieren kann. Es gibt Hinweise, dass die lösliche Form des CD70 auch eine direkte biologische Aktivität haben könnte. Ein löslicher kostimulatorischer Ligand ist deshalb interessant, weil er eine Immunaktivierung erleichtern und besonders günstige Gewebsverteilung aufweisen könnte. Um den Anti-Gliom Effekt des löslichen CD70 (sCD70) untersuchen zu können, wurden Maus-Gliomzellen genetisch so modifiziert, dass sie die extrazelluläre Domäne des CD70 sekretierten. Die Immunogenität von transfizierten Zellen wurde in Kulturen mit immunen Effektorzellen durch das Maß der Immunzellproliferation und die Interferon-gamma-Freisetzung bestimmt. Syngenem VM/Dk Mäusen wurden sCD70-freisetzende oder Kontroll-Gliome orthotopisch implantiert, um einen möglichen Effekt des sCD70 hinsichtlich eines besseren Überlebens zu bestimmen. Zelldepletionen wurden durchgeführt, um die zellulären Mediatoren eines verlängerten Überlebens bei sCD70-freisetzenden gliomtragenden Mäusen bestimmen zu können. Es konnte zunächst *in vitro* gezeigt werden, dass die ektopische Expression von sCD70 zu einer erhöhten Proliferation und Interferon-gamma Freisetzung bei syngenem Milzlymphozyten führt. *In vivo* konnte sogar gezeigt werden, dass das sCD70 das Überleben von Mäusen, die ein intrakraniales Gliom aufwiesen, verlängern konnte. Die Überlebensrate bei 60 Tagen stieg von 5 % ohne Behandlung auf 45 % mit Behandlung an. Durch eine Depletion von CD8-positiven T-Zellen mittels spezifischer Antikörper wurde dieser sCD70-vermittelte Überlebenseffekt aufgehoben. Diese Daten zeigen, dass sCD70 ein potenter Stimulator einer anti-Gliom Immunantwort ist, die von CD8-positiven T-Zellen getragen ist. Lösliches CD70 könnte somit ein vorteilhaftes Adjuvans für eine zukünftige Immuntherapie bei Glioblastomkrankungen sein.

MILLER *et al.* 2010. Soluble CD70: a novel immunotherapeutic agent for experimental glioblastoma. *J Neurosurg* 113:280-285

Indiana University, Indianapolis (USA); Eberhard-Karls- Universität, Tübingen; Universität Spital, Zürich (Schweiz); Friedrich-Loeffler-Institut, IfI

5.3 IMMUNSYSTEM DER FISCHE

Dem Immunsystem der Säuger ähnlich bilden Fische lösliche immunrelevante Faktoren (Immunglobuline, Zytokine etc.) und verfügen über Leukozytensubpopulationen, die die Immunantwort gegenüber einer Reihe von Pathogenen manifestieren. Die Existenz von spezifischen zytotoxischen Zellen und natürlichen Killerzellen (NK)-ähnlichen Zellen wurde bei Fischen bereits in allogenen, xenogenen und virusinfizierten Effektor/Zielzellsystemen gezeigt. Expressionsstudien bezüglich der bisher bekannten immunrelevanten piscinen Gene und Moleküle (z. B. MHC, CD8, CD56 und CD3) deuten darauf hin, dass bei Fischen ähnliche Immunmechanismen wie bei Säugern existieren. T-Zell- und NK-Zellsubpopulationen können jetzt bei Salmoniden mittels polyklonaler und monoklonaler Antikörper direkt identifiziert werden, da geeignete Antikörper gegen CD8 bzw. CD56 und gegen T-Zellen (CD3) verfügbar sind. Ein Teil dieser Arbeiten befasste sich mit immunologisch relevanten Zellkompartimenten bei Salmoniden, wobei ein bisher unentdecktes lymphatisches Gewebe bei Fischen erstmals beschrieben wurde (ILT – Interbranchial Lymphoid Tissue). Weiterhin wurde ein neues Gen entdeckt, welches vermutlich bei der Aktivierung pisciner Thrombozyten eine Rolle spielt.

Antigenaufnehmende Zellen im Darmepithel von Salmoniden

Die Aufnahme von Antigenen im Darm von Knochenfischen ist bisher mehrfach gezeigt worden. Es ist jedoch wenig darüber bekannt, welche Zellen in diesen Prozess involviert sind, wobei M-Zellen als eine der wichtigsten Komponenten bei Fischen bisher nicht beschrieben worden sind. Unsere Arbeiten haben gezeigt, dass epitheliale Zellen von Salmoniden zur Aufnahme von BSA-beschichteten Goldpartikeln befähigt sind. Mittels Licht- und Elektronenmikroskopie wurde nachgewiesen, dass die Aufnahme von BSA-Goldpartikeln durch einige wenige, dendritischen Zellen ähnelnde, und einige morphologisch auffällige epitheliale Zellen erfolgte, wobei letztere vor allem in den Mukosafalten des zweiten Mitteldarmsegments zu finden waren. Die goldpositiven epithelialen Zellen zeichneten sich lumenseitig durch divergierende elektronendichte Mikrovilli und durch von diesen in die Tiefe des Zytoplasma reichende Kanälchen aus. Neben diesen morphologischen Untersuchungen wiesen Lektinbindungsstudien darauf hin, dass diese Zellen Eigenschaften von unreifen M-Zellen aufweisen und somit evolutionär frühe Antigen-aufnehmende Enterozyten darstellen könnten.

FUGLEM *et al.* 2010. Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium *Dev Comp Immunol* 34:768-74.

Norwegian School of Veterinary Science, Oslo (Norwegen); University of Bari (Italien); University of Tokyo (Japan); University of Copenhagen, Frederiksberg (Dänemark); Friedrich-Loeffler-Institut, IMED

Charakterisierung eines Moleküls in Knochenfischen mit Ähnlichkeiten zu humanem, MHC-kodiertem G6F

Bei Knochenfischen wurde ein neues Gen, genannt *G6F-like*, gefunden, welches für ein Typ I-Transmembranmolekül mit vier extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen sowie mit einer zytoplasmatischen Domäne kodiert. Letztere trägt ein putatives Tyrosinphosphorylierungsmotif (YxN) und ein immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). Die Genomorganisation von *G6F-like* stellt somit eine Art Ur-MHC kiefertragender Vertebraten dar. Das vorhergesagte *G6F-like*-Molekül zeigt Sequenzhomologien zu Vertretern der CD4/LAG-3-Familie und zum humanen, MHC-kodierten Thrombozytenmarker G6F. Das *G6F-like*-Gen von Knochenfischen und das G6F-Gen von Tetrapoden scheinen ortholog zu sein, da beide eine ähnliche genomische Lokalisation aufweisen, über typische transmembrane und zytoplasmatische Motive verfügen und von Thrombozyten bzw. Blutplättchen exprimiert werden. In Karauschen wurde das *G6F-like*-Gen nicht nur von Thrombozyten, sondern auch von Erythrozyten exprimiert, was darauf hindeutet, dass erythroide und thromboide Zellen von Knochenfischen, wie die von Säugern, eine gemeinsame hämatopoietische Abstammung haben. Das Vorhandensein eines ITAM lässt vermuten, dass G6F eine wichtige Rolle bei der Zellaktivierung spielt. Die Expression von *G6F-like* in Erythrozyten weist darauf hin, dass diese überlappende Funktionen mit Thrombozyten aufweisen.

OHASHI *et al.* 2010. A molecule in teleost fish, related with human MHC-encoded G6F, has a cytoplasmic tail with ITAM and marks the surface of thrombocytes and in some fishes also of erythrocytes. *Immunogenetics* 62:543-59.

Nihon University, Fujisawa; Fujita Health University, Toyoake; National Research Institute of Aquaculture, Tamaki (alle Japan); Friedrich-Loeffler-Institut, IMED

Beschreibung eines neuartigen Interbranchialen Lymphatischen Gewebes in Salmoniden

Der Mangel an Antikörpern gegen Leukozytenmarker ist immer noch ein limitierendes Kriterium bei der Erforschung des Immunsystems bei Knochenfischen. Deshalb haben wir ein Antiserum gegen die ϵ -Kette des CD3 von Lachsen generiert. Mittels Durchflusszytometrie wurden hohe Konzentrationen von CD3 ϵ (+) T-Zellen im Thymus, der Kieme und im Darm festgestellt, wohingegen diese Zellen in der Kopfniere, in der Milz und im peripheren Blut weniger häufig zu finden waren. In histologischen Schnitten fanden sich T-Zellakkumulationen im Thymus und der Milz, sowie in einem

gerade erst entdeckten kiemenbasierten Interbranchialen Lymphatischen Gewebe (ILT). In letzterem sind die T-Zellen in einem Netzwerk von epithelialen Zellen eingebettet, während CD3 ϵ (+) Zellen in der Milz vor allem in der weißen Pulpa zu finden sind, wo sie die Ellipsoide umschließen. Die anatomische Organisation der Thymuscortex und -medulla scheint in Salmoniden aus drei Schichten zu bestehen: einer subepithelialen Medulla-ähnlichen Zone, einer intermediären Cortex-ähnlichen Zone und einer weiteren Cortex-ähnlichen basalen Zone. Im Darm konnten zahlreiche intraepitheliale T-Zellen beobachtet werden, während in nichtlymphatischen Organen nur wenige T-Zellen zu finden waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass das ILT ein sehr wichtiger Ort der T-Zellaggregation ist und dass dieses Gewebe kaum Ähnlichkeiten zu bisher beschriebenen lymphatischen Organen bei Fischen hat.

KOPPANG *et al.* 2010. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *J Anat* 217:728-39.

Norwegian School of Veterinary Science, Oslo; University of Bergen, (beide Norwegen); Fujita Health University, Toyoake (Japan); National Centre for Digestive Diseases, Bari; University of Bari (beide Italien); Friedrich-Loeffler-Institut, IMED

Effekte von polyzyklischen aromatischen Hydrokarbonen (PAH) auf das Immunsystem der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

In dieser Studie sollten potentielle immuntoxische Effekte polyzyklischer aromatischer Hydrocarbone auf die Immunfunktionen von Fischen am Modell Regenbogenforelle untersucht werden. Als Modellschubstanz wurden unterschiedliche Dosen von Reten gewählt, das als Alkyl-PAH generell in industriellen Abwässern zu finden ist. Regenbogenforellen wurden dazu intraperitoneal mit 0; 1; oder 10 mg/kg Reten einmalig belastet. Parallel dazu wurde die Immunantwort durch intraperitoneale Injektion von 10^7 inaktivierten *Aeromonas-salmonicida*-Partikeln pro Fisch stimuliert. Die höchste Dosis von Retenen induzierte erhöhte Werte von Blutleukozyten jedoch nur in Kombination mit der Immunisierung. Die *A. salmonicida*-spezifischen Antikörpertiter waren in dieser Reten-Gruppe (10 mg/kg) ebenfalls signifikant erhöht. Immunhistologisch wurde eine erhöhte Anzahl von B-Lymphozyten in Milz und Kopfniere nachgewiesen. Transkripte von immunregulatorischen Molekülen der Th1 Antwort (CD8 und IFN γ) waren in ihrer Expression nicht erhöht, jedoch Moleküle der Th2 Antwort (CD4, TNF α , MHCII). Die Daten belegen, dass ein immuntoxikologischer Effekt im Sinne einer Hemmung der Immunantwort auf bakterielle Antigene eher nicht vorliegt, sondern dass PAHs eher als unspezifische Stimulatoren anzusehen sind.

HOGAN *et al.* 2010. The effects of the alkyl polycyclic aromatic hydrocarbon retene on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response. *Aquat Toxicol* 100:246-54.

University of Prince Edwards Island (Kanada); Friedrich-Loeffler-Institut, IMED

Molekulare Charakterisierung von PRR13 und seine Gewebsverteilung in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Das Prolin-reiche Protein 13 ist eines der Schlüsseltene der Zytostatika-Resistenzen und bewirkt eine Reduzierung pro-apoptotischer Moleküle wie Thrombospondin-1. Das komplette PRR13-Gen der Forelle wurde sequenziert und enthält 4 Exons und drei Introns, wobei das letzte mit 100 bp sehr kurz ist. Die komplette cDNA hat eine Länge von 1100 Nukleotiden und ein offenes Leseraster von 563 bp, das für ein Protein von 187 Aminosäuren (18,8 kDa) kodiert. Eine Sequenz von 10 aufeinanderfolgenden Serinen ist hoch konserviert und typisch für PRR-Proteine aller bisher untersuchten Vertebraten. Phylogenetisch unterscheidet sich das PRR13 der Forelle jedoch klar von denen der Amphibien oder Säuger.

Der Vergleich der Gewebsverteilung von PRR 13 in zwei unterschiedlich resistenten Forellenlinien (TCO Steelhead II-WA gegen BORN Steelhead II-Germany) zeigt eine deutlich höhere Expression in nahezu allen Geweben der Born-Linie, am deutlichsten jedoch in Kieme und Leber. Aufgrund dieser Daten wird vermutet, dass die erhöhte Expression von PRR13 möglicherweise ein Grund für die erhöhte Resistenz der BORN Forellen gegen Umweltstressoren ist.

VERLEIH *et al.* 2010. Molecular characterization of PRR13 and its tissue-specific expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Fish Physiol Biochem* 36:1271-6.

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf; Friedrich-Loeffler-Institut, IMED

Pantothenensäure in der Wiederkäuerernährung

Pantothenensäure spielt wegen ihres Einbaus in das Coenzym A und das Acyl-carrier-Protein eine essentielle Rolle im Stoffwechsel. Wie alle B-Vitamine kann Pantothenensäure durch die Mikroorganismen im Pansen der Wiederkäuer synthetisiert werden. Bis heute ist jedoch ungeklärt, ob die Synthese den Bedarf hochleistender Milchkühe decken kann. Zudem scheint die Synthese vom Verhältnis von Grund- zu Kraftfutter in der Ration beeinflusst zu werden. Auch ist nicht klar, ob orale Pantothenensäurezulagen den Pantothenensäurefluss am Dünndarm nennenswert erhöhen können. Nach Literaturangaben verschwinden etwa 80 % von supplementierter Pantothenensäure bis zum Duodenum. Allerdings können Pantothenensäurezulagen die Pantothenensäurekonzentration im Blutserum erhöhen.

RAGALLER *et al.* 2011. Pantothenic acid in ruminant nutrition: a review. *J Anim Physiol Anim Nutr* 95:6-16

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE

Folsäure in der Wiederkäuerernährung

Folsäure spielt eine essentielle Rolle im DNA- und Methionin-Stoffwechsel. Bisher ist jedoch ungeklärt, ob die Menge an mikrobiell im Pansen synthetisierter Folsäure für eine optimale Versorgung von Milchkühen ausreicht, da diese möglicherweise von der Rationszusammensetzung beeinflusst wird. Der Abbau von supplementierter Folsäure im Pansen scheint mit etwa 97 % sehr hoch zu sein. Allerdings erhöhten Zulagen von mehr als 0,5 mg/kg Körpergewicht die Folsäurekonzentration im Blutserum und in der Milch in den meisten Untersuchungen. Außerdem stieg in einigen Versuchen die Milchproduktion. Es wird daraus gefolgert, dass der Abbau im Pansen überschätzt wird.

Im Rahmen von zwei Versuchen an fistulierten Milchkühen wurde der Einfluss einer Supplementierung einer grund- und einer kraftfutterreichen Ration mit 1 g Folsäure auf die Pansenfermentation, den Nährstofffluss am Duodenum sowie verschiedene Blut- und Milchparameter untersucht. Unabhängig von der Rationszusammensetzung hatte die Zulage von Folsäure keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Umsetzungen im Pansen sowie die Blut- und Milchparameter. Lediglich ein Anstieg der Konzentration an 5-methyl-tetrahydrofolat im Blutserum konnte beobachtet werden. Die Frage, ob Milchkühe einen Nutzen von der Folsäuresupplementierung haben, konnte anhand der durchgeführten Versuche nicht abschließend beantwortet werden. Hierfür wären Versuche mit größerer Tierzahl in unterschiedlichen Stoffwechsellagen und eine Unterscheidung in den Folsäurebedarf des Wirtstieres und der Pansenmikroben erforderlich.

RAGALLER *et al.* 2009. Folic acid in ruminant nutrition: a review. *Br J Nutr* 101:153-164.

RAGALLER *et al.* 2010. Effects of folic acid supplementation to rations differing in the concentrate to roughage ratio on ruminal

6 TIERERNÄHRUNG

6.1 FUTTERMITTELZUSATZSTOFFE

6.1.1 Vitamine

Die Vitamine der B-Gruppe zählen zu den wasserlöslichen Vitaminen. Hierzu gehören Thiamin (B₁), Riboflavin (B₂), Pyridoxin (B₆), Cobalamin (B₁₂), Biotin, Folsäure, Niacin und Pantothenensäure. Die Zusammenfassung dieser Vitamine in einer Gruppe ist allerdings ausschließlich historisch bedingt und spiegelt nicht deren sehr unterschiedliche Strukturen und metabolischen Funktionen wider. Ein gemeinsames Merkmal aller B-Vitamine ist jedoch, dass alle wichtige Coenzym-Funktionen im Stoffwechsel besitzen. Sie sind also essentiell für Leistung und Gesundheit bei Mensch und Tier. Dem Wiederkäuer steht neben dem Futter noch eine weitere B-Vitamin-Quelle zur Verfügung, da die Mikroorganismen im Pansen diese synthetisieren können. Die mikrobielle Vitamin-Synthese wird bisher als für die Kuh bedarfsdeckend angenommen. Allerdings ist wenig über eventuelle Einflüsse auf die Syntheseleistung bekannt.

fermentation, nutrient flow at the duodenum, and on serum and milk variables of dairy cows. *Arch Anim Nutr* 64:484–503.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

6.1.2 Nicht lebensnotwendige Futtermittelzusatzstoffe

Einfluss exogener fibrolytischer Enzyme auf die Pansenfermentation und die Nährstoffverdauung bei Milchkühen

Der Abbau von pflanzlichen Zellwänden durch Mikroorganismen und ihre Enzyme ist maßgeblich am globalen Kohlenstoffzyklus beteiligt und ein Schlüsselprozess bei der landwirtschaftlichen Produktion von Milch, Fleisch und Wolle durch Wiederkäuer. Allerdings ist die Faserverdauung im Wiederkäuerpansen nicht immer optimal, was sich darin zeigt, dass mit dem Kot noch fermentierbare Faser ausgeschieden wird. Deshalb war es Ziel eines Versuches mit fistulierten Milchkühen den Einfluss eines exogenen, fibrolytischen Enzymproduktes auf die Pansenfermentation, die mikrobielle Proteinsynthese, die Nährstoffverdaulichkeit sowie die Milchmenge und –zusammensetzung nach Zulage zu einer Totalen Mischration zu prüfen. Es zeigte sich, dass die Zulage von 6,2 ml des getesteten fibrolytischen Enzyms (Roxazyme® G2 Liquid) je kg Futtertrockenmasse vor der Fütterung, unter den gegebenen Versuchsbedingungen, zu keiner signifikanten Verbesserung der Nährstoffverdaulichkeit oder der Milchproduktion führte.

PETERS *et al.* 2010. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and nutrient digestion in dairy cows. *Arch Anim Nutr* 64:221–237.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Martin-Luther-Universität Halle

6.1.3 Seltene Erden

Vor dem Hintergrund einer wachsenden Weltbevölkerung wird von der Tierproduktion einerseits ein Beitrag zur Sicherstellung der Ernährung der Menschen, andererseits aber auch die Schonung der verfügbaren Ressourcen gefordert. Aus diesem Grund gibt es schon seit längerer Zeit Bemühungen, effektive und sichere Futtermittelzusatzstoffe zu finden, die in der Lage sind, bei hohem Leistungsniveau der Nutztiere die Effizienz der Umwandlung von Futtermitteln in Lebensmittel tierischer Herkunft nachhaltig zu verbessern. In diesem Zusammenhang sind auch Seltene Erden (SE) in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Diese werden in Europa bisher nur in der Schweiz eingesetzt. Zu den SE gehören 17 Übergangsmetalle aus der 3. Nebengruppe des Periodensystems. Hierbei handelt es sich um die Elemente

Lanthan, Scandium und Yttrium sowie die 14 Lanthanoide. In der ostasiatischen Landwirtschaft werden SE-Verbindungen bereits in der Tierproduktion verwendet, wobei Untersuchungsergebnisse aus dem Bereich der Wiederkäuerernährung derzeit nicht verfügbar sind.

Dosis-Wirkungs-Untersuchung zum Einsatz von seltenen Erden in der Mastrinderernährung

In einer Dosis-Wirkungs-Untersuchung wurde der Einfluss von SE auf die Nährstoffverdaulichkeit sowie die Mast- und Schlachtleistung bei Mastbullen geprüft. Die aus Maissilage und Kraftfutter bestehende Ration enthielt für die in vier Gruppen aufgeteilten Tiere (n=11 bzw. 12) neben einer nicht supplementierten Kontrolle Zulagen von 100, 200 und 300 mg SE-Citrat je kg Trockensubstanz(T)-Aufnahme. Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen führte der Einsatz von SE bei schwarzbunten Mastbullen während der gesamten Mastperiode zu einer Verringerung der Futteraufnahme um bis zu 9 %. Hieraus resultierte eine um 4 bis 5 % geringere Lebendmassezunahme. Die ebenfalls durchgeführte Prüfung der Nährstoffverdaulichkeit bei Supplementation mit SE ergab keinen positiven Effekt auf den Futterwert der eingesetzten Ration. Bezüglich einzelner Schlachtleistungsparameter wurde nur für die Gruppe mit 200 mg SE-Citrat/kg T eine Verbesserung beobachtet. Somit führte der Einsatz von SE in der vorliegenden Untersuchung zur keiner Beeinflussung der zootechnischen Leistungsparameter.

SCHWABE *et al.* 2010. Effect of graded levels of rare earth elements in diets of fattening bulls on growing and slaughtering performance, and on nutrient digestibility of wethers. *Arch Anim Nutr* [Epub ahead of print; doi:10.1080/1745039X.2010.520408]

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE

6.2 MYKOTOXINE

Als Mykotoxine werden Stoffwechselprodukte des Sekundärstoffwechsels von Schimmelpilzen bezeichnet, die bei höheren Organismen in geringsten Mengen zu Vergiftungserscheinungen führen können. Aus Sicht der Tierernährung kommt einigen Mykotoxinen der Schimmelpilzgattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* eine besondere Bedeutung zu, da sie in Konzentrationen in Futtermitteln vorkommen können, die bei landwirtschaftlichen Nutztieren Intoxikationen hervorrufen können. Ein Beispiel ist Aflatoxin B1, das u. a. von *A. flavus* gebildet wird und das aufgrund seiner Toxizität und seines Rückstandsverhaltens mit Höchstgehalten für Futtermittel belegt ist. Weitere Beispiele sind Deoxynivalenol und Zearalenon, die u. a. von *F. graminearum* und *F. culmorum* synthetisiert werden. Aufgrund ihres negativen Effektes auf die Tiergesundheit bei vernachlässigbarem Carry-over-Verhalten wurden für diese Mykotoxine nur Richtwerte für kritische Konzentrationen in Fut-

ermitteln festgelegt. Die Alkaloide, die vom Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* gebildet werden, gehören ebenfalls in die Gruppe der Mykotoxine.

Unter den Fusarium-Mykotoxinen sind insbesondere DON und ZON von Bedeutung, da sie bereits auf dem Feld vor der Ernte gebildet werden und trotz pflanzenbaulicher Minimierungsstrategien infolge des Witterungseinflusses häufiger vorkommen können.

Unter den Nutztieren ist insbesondere das Schwein empfindlich, das auf höhere Konzentrationen an DON mit einem Futterverzehrsrückgang und an ZON mit Hyperöstrogenismus und Fertilitätsstörungen reagiert. Wiederkäuer und Geflügel werden als weniger empfindlich angesehen.

Feuchtkonservierung von DON-kontaminiertem Getreide

Eine solche Behandlung führt in Gegenwart von Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, SBS) zu einer nahezu vollständigen Reduktion des DON-Gehaltes, wobei der Rückgang auf die Bildung von DON-Sulfonat (DONS) zurückgeführt wird.

Ziel der Untersuchungen mit Weizen war es, bei einer SBS-Zulage von 5 g/kg die von der Lagerungsdauer abhängige Kinetik sowohl der DON-Reduktion als auch der DONS-Bildung gleichzeitig zu verfolgen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der bi-exponentielle DON-Abfall durch einen bi-exponentiellen Anstieg der DONS-Konzentration reflektiert wurde.

Nach Verfütterung von so behandeltem DON-kontaminiertem Triticale an Ferkel konnte DONS im Blut nachgewiesen werden, während DON nur in Spuren nachweisbar war. Diese Befunde deuten darauf hin, dass DONS unter den Bedingungen des porcinen Verdauungstraktes nicht wieder zu DON re-konvertiert wird. Zur Toxizität von DON im Vergleich zu DONS wurden *In-vitro*-Studien an verschiedenen porcinen Zelltypen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass DONS im Vergleich zur Ausgangssubstanz DON durch eine deutlich verminderte Zytotoxizität charakterisiert war. Die *In-vivo*-Relevanz dieser Befunde muss in weiteren Tierstudien verifiziert werden.

DÄNICKE *et al.* 2010. Investigations on the kinetics of the concentration of deoxynivalenol (DON) and on spoilage by moulds and yeasts of wheat grain preserved with sodium metabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, SBS) and propionic acid at various moisture contents. *Arch Anim Nutr* 64:190-203.

DÄNICKE *et al.* 2010. Studies on the toxicity of deoxynivalenol (DON), sodium metabisulfite, DON-sulfonate (DONS) and de-epoxy-DON for porcine peripheral blood mononuclear cells and the Intestinal Porcine Epithelial Cell lines IPEC-1 and IPEC-J2, and on effects of DON and DONS on piglets. *Food Chem Toxicol* 48:2154-2162.

DÄNICKE *et al.* 2010. Effects of oral exposure of pigs to deoxynivalenol (DON) sulfonate (DONS) as the non-toxic derivative of DON on tissue residues of DON and de-epoxy-DON and on DONS blood levels. *Food Addit Contam* 27:1558-1565.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Julius Kühn-Institut, Braunschweig; Tierärztliche Hochschule Hannover; Otto-von-Guericke Universität Magdeburg; Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Wirkung eines probiotischen Futterzusatzstoffes bei Verfütterung von DON-kontaminiertem Ferkelfutter

Verschiedene *In-vitro*-Studien konnten zeigen, dass bestimmte Mikroorganismen in der Lage sind, DON zu detoxifizieren. Ziel der vorliegenden Studie war es, ein Probiotikum, das Sporen von *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* enthält und das futtermittelrechtlich zur Stabilisierung der Darmgesundheit und zur Leistungssteigerung zugelassen ist, hinsichtlich seiner Wirkungen bei DON-kontaminiertem Futter zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die leistungsdepressiven DON-Effekte nicht durch das Probiotikum kompensiert werden konnten. Zudem war die DON-Konzentration im Blut der Ferkel, welchen die Probiotikum enthaltende Futtermischung gefüttert wurde, nicht reduziert. Dies deutet darauf hin, dass DON durch das Probiotikum im Verdauungstrakt nicht detoxifiziert wurde.

DÄNICKE, S. UND S. DÖLL. 2010. A probiotic feed additive containing spores of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* does not prevent absorption and toxic effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol in piglets. *Food Chem Toxicol* 48:152-158.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE

Wirkung von DON auf gravide Sauen

Ziel der Untersuchung war es, den Einfluss einer oralen und einer systemischen DON-Exposition auf gravide Sauen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Sauen im Zeitraum zwischen dem 63. und 70. Trächtigkeitstag entweder über das Futter oder über intraperitoneale osmotisch arbeitende Minipumpen gegenüber DON exponiert. Am 70. Trächtigkeitstag wurden die Feten über Kaiserschnitt entwickelt. Unabhängig vom Verabreichungsweg hatte DON keinen Einfluss auf den Erhalt der Trächtigkeit und weitere Reproduktionsmerkmale und verursachte keine makroskopischen oder histopathologischen Läsionen der untersuchten Organe.

GOYARTS *et al.* 2010. On the effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) administered per os or intraperitoneal infusion to sows during days 63 to 70 of gestation. *Mycotox Res* 26:119-131.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Universität Leipzig; Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

6.3 NEBENPRODUKTE DER BIO-KRAFTSTOFFHERSTELLUNG

Die hohe Nachfrage nach Energie führt in Verbindung mit anderen Einflussfaktoren zu einer steigenden Produktion von Biokraftstoffen, wie Ethanol, Biodiesel und Pflanzenöl. Während des Produktionsprozesses werden für die Kraftstoffherstellung vornehmlich Stärke und Fett verwendet, so dass proteinreiche Nebenprodukte, z. B. Schlempe oder Rapsextraktionsschrot für den Einsatz als Futtermittel zurück-

bleiben. Insbesondere bei der Ethanolproduktion führen die Variabilität der Produktionsprozesse und die Auswahl der verwendeten Rohstoffe zu Differenzen in der Futtermittelqualität. Hierzu liegen bisher, insbesondere im Bereich der Mastrinderernährung, kaum neuere Ergebnisse vor.

Untersuchungen zum Einsatz von Nebenprodukten der Biokraftstoffherstellung in der Bullenmast

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, den Einsatz von Rapsextraktionsschrot (RES), von auf Weizen- und Gerstebasis hergestellter Getreideschlempe sowie einer Mischung von RES und Getreideschlempe mit Sojaextraktionsschrot hinsichtlich deren Auswirkungen auf die Mast- und Schlachtleistungen von schwarzbunten Mastbullen auf Basis isonitrogener Rationen zu vergleichen. Mit annähernd 1400 g/Tag lag die mittlere Lebendmassezunahme der Bullen auf hohem Niveau. Dabei wiesen die mit einer Kombination von RES und Getreideschlempe versorgten Tiere die höchste Lebendmassezunahme und die ausschließlich mit RES als Proteinfuttermittel versorgten Tiere den geringsten Energieaufwand für die Lebendmassezunahme auf. Der Einsatz von RES, der Getreideschlempe sowie von RES in Kombination mit Getreideschlempe führte gegenüber der Verwendung von Sojaextraktionsschrot in der Kontrollration zu vergleichbaren Ergebnissen bei der Mast- und Schlachtleistung. Deshalb können die als Nebenprodukte u. a. bei der Biokraftstoffherstellung anfallenden proteinreichen Futtermittel Getreideschlempe und RES als alleinige Proteinergänzung in Rationen auf Maissilagebasis für schwarzbunte Mastbullen eingesetzt werden.

MEYER *et al.* 2010. Effects of by-products from biofuel production on the performance of growing fattening bulls. *Anim Feed Techn* 161:132-139.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE

7 TIERSCHUTZ UND TIERHALTUNG

Voraussetzung für die Bewertung möglicher Belastungen durch die Haltungsformen ist das Verständnis der Mechanismen, mit denen sich die Tiere an ihre Haltung anpassen können. Berücksichtigt werden insbesondere Mechanismen der Verhaltenssteuerung (motivationale und kognitive Steuerungsmechanismen) sowie physiologische (stressphysiologische und immunologische) und molekulare Mechanismen. Gleichzeitig werden die Ansprüche der Nutztiere gegenüber der Haltungsumwelt im Hinblick auf Verhalten und Tiergesundheit untersucht. Dabei müssen auch Faktoren berücksichtigt werden, die die Anpassungsreaktionen der Tiere an

die Haltungsbedingungen determinieren oder modifizieren. Für eine objektivierbare Bewertung der Auswirkungen von Haltungsbedingungen auf die Tiere werden Indikatoren neu oder weiterentwickelt. Da sich die Haltung in komplexer Weise auf verschiedene Reaktionssysteme der Tiere auswirkt, müssen zur Interpretation der Auswirkungen meist mehrere Indikatoren aus verschiedenen Fachdisziplinen herangezogen werden. Für die Bewertung von Haltungssystemen und -einrichtungen müssen die Indikatoren hinsichtlich ihrer Praktikabilität angepasst und innovative Indikatoren validiert werden.

Eine tiergerechte Haltung ermöglicht den Tieren die Ausübung wesentlicher Aspekte ihres Verhaltensrepertoires und schafft die Voraussetzungen, sich erfolgreich mit der Haltungsumwelt auseinandersetzen zu können, ohne dass es zu Risiken für die Tiergesundheit kommt. Neben den Aspekten der Tiergerechtigkeit müssen weitere relevante Gesichtspunkte wie beispielsweise die Wirtschaftlichkeit, die Verfahrenssicherheit und der Umweltschutz einbezogen werden. Dies erfordert oft komplexe Forschungsansätze. Die enge Zusammenarbeit mit der Praxis stellt dabei eine wichtige Grundlage dar, um auftretende Probleme zu identifizieren, signifikante Haltungsfaktoren gezielt und kurzfristig zu ermitteln und nachfolgend konkrete Lösungsansätze zu entwickeln.

7.1 GEFLÜGELHALTUNG

Der Einfluss von Material und Durchmesser von Sitzstangen auf das Aufbaumverhalten von Legehennen

Das Ruhen auf Sitzstangen, das sogenannte Aufbaumen, stellt für Legehennen ein wichtiges Verhalten dar, für das sie hoch motiviert sind. Daher sind Sitzstangen EU-weit ab 2012 für alle Haltungssysteme für Legehennen vorgeschrieben. Allerdings ist die Nutzung von Sitzstangen auch mit Gesundheitsproblemen wie Erkrankungen der Fußballen und Deformationen der Brustbeine assoziiert, was auf ein unzureichendes Design der Sitzstangen zurückzuführen sein könnte. Ziel der Untersuchung war daher, zu prüfen, ob spezifische Verhaltensweisen von Legehennen während des nächtlichen Ruhens auf verschiedenen Sitzstangen Aussagen über die Eignung von Sitzstangen zulassen. Insgesamt 60 Legehennen wurden in zwei Versuchsdurchgängen in jeweils sechs Abteilen gehalten. In jedem Abteil wurde in zufälliger Reihenfolge für jeweils eine Woche eine von neun runden Sitzstangen angeboten, die sich im Material (Holz, Stahl, gummierte Oberfläche) und im Durchmesser (27, 34, 45 mm) unterschieden. Über eine Nacht wurden jeweils die Verhaltensweisen Ruhen, Stehen, Gefiederpflege, Balancebewegungen sowie Komfortverhalten beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass Balancebewegungen mit zunehmendem Durchmesser der Sitzstangen abnahmen und

seltener auf gummierten Sitzstangen gezeigt wurden. Auf den Stahlstangen ruhten die Hennen häufiger mit ihrem Kopf im Gefieder. Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die detaillierte Analyse des Ruheverhaltens von Legehennen wichtige Informationen über die Eignung von Sitzstangen liefern kann. Insbesondere Balancebewegungen scheinen sensitiv hinsichtlich der Rutschfestigkeit von Sitzstangen zu sein. Die Ruheposition scheint hingegen eher mit der Thermoregulation der Tiere zusammenzuhängen.

PICKEL *et al.* 2010. Perch material and diameter affects particular perching behaviours in laying hens. *Appl Anim Behav Sci* 127:37-42.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Wahlversuche mit unterschiedlichen Einstreumaterialien für Legehennen

Ab 2012 muss EU-weit in allen Haltungssystemen für Legehennen Einstreumaterial zur Nahrungssuche (Scharren, Picken) und zum Staubbaden angeboten werden. Gegenwärtig wird in ausgestalteten Käfigen oder der Kleingruppenhaltung zumeist Futter als Einstreu verwendet, das den Hennen in kleinen Mengen auf Kunstrasenmatten angeboten wird. In dieser Untersuchung testeten wir daher die Präferenz von Legehennen für Futter und drei weitere Einstreusubstrate zur Nahrungssuche und zum Staubbaden. In zwei Durchgängen wurden Legehennen zweier genetischer Herkünfte in 12 Abteilen zu jeweils sechs Tieren gehalten. In allen Abteilen bestand der Boden aus Plastikgitter und es wurden vier Einstreubereiche angeboten (jeweils 1.000 cm² je Henne). Die Einstreubereiche enthielten Hobelspäne, Lignozellulose (pelletierte Holzspäne), Kunstrasen ohne Einstreumaterial sowie Legehennenfutter. Die gegenüber Einstreu naiven Legehennen wurden ab der 18. Lebenswoche in den Versuchsabteilen gehalten und die Nutzung der Einstreubereiche wurde in der 21., 24. und 27. Lebenswoche per Video aufgezeichnet. Aus diesen Aufnahmen wurden die Dauern und Häufigkeiten des Staubbadens, der Nahrungssuche sowie die Dauern einzelner Verhaltenselemente des Staubbadens ausgewertet. Die Einstreubereiche mit dem Futter wurden signifikant zur Nahrungssuche gegenüber den anderen Einstreubereichen bevorzugt. Zum Staubbaden bevorzugten die Hennen jedoch eindeutig die Einstreubereiche mit Lignozellulose. Die durchschnittliche Dauer der einzelnen Staubbadevorgänge war im Futter länger als in Lignozellulose und Hobelspänen. Weiterhin wurden noch Unterschiede für die einzelnen Verhaltenselemente des Staubbadens in Abhängigkeit vom Substrat gefunden. Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass für Legehennen Futter als Einstreu zwar zur Nahrungssuche geeignet ist, sich als Substrat zum Staubbaden jedoch kaum eignet.

SCHOLZ *et al.* 2010. Food, wood, or plastic as substrates for dustbathing and foraging in laying hens: A preference test. *Poultry Sci* 89:1584-1589.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Nutzung von Funktionsbereichen in verschiedenen ausgestalteten Käfigen und Kleingruppenhaltungen (EU-Norm)

Auf zwei experimentellen Farmen wurden im Rahmen eines Projektes der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover über insgesamt drei Legedurchgänge Verhaltensuntersuchungen an Legehennen unterschiedlicher genetischer Herkunft in verschiedenen ausgestalteten Käfigen und Kleingruppenhaltungen (EU-Richtlinie) durchgeführt, die sich unter anderem in der Gruppengröße und der Anordnung der Sitzstangen unterschieden. Bei den untersuchten Haltungssystemen waren entweder die innen liegenden Sitzstangen, die Sitzstangen an den Außentrögen oder beide Sitzstangen stufig erhöht. Während der Lichtphase wurde die Verteilung der Hennen innerhalb der Abteile (Gitterboden, Einstreubereich, Nest, Sitzstangen), das Ruhe- und Bewegungsverhalten sowie das Staubbade- und Pickverhalten mittels Direktbeobachtung erfasst. Die meisten Bewegungsaktivitäten wurden in Abteilen für größere Gruppen (Kleingruppenhaltung) gezeigt, wobei sich hierauf auch eine stufig erhöhte Anordnung beider Sitzstangen positiv auswirkte, da sich die Hennen auch über längere Distanzen fortbewegen konnten, ohne Sitzstangen überqueren zu müssen. In allen Haltungssystemen wurden die Legenester während des Tages als Rückzugsort aufgesucht. Staubbäder wurden vermehrt für andere Aktivitäten genutzt als für Staubbadeaktivitäten. Die Nutzung der Sitzstangen war in Abteilen mit nicht erhöhten Sitzstangen am höchsten. Die Studie zeigte, dass sich Abteile für größere Hennengruppen positiv auf das Bewegungsverhalten der Tiere auswirken können, da hier insgesamt mehr Bewegungsfläche zur Verfügung steht. Auch wenn in diesen größeren Abteilen die Einstreubereiche besser genutzt wurden als in den kleineren, ausgestalteten Käfigen, waren die Möglichkeiten zum Komfortverhalten (z. B. Staubbadeverhalten) noch unzureichend. Die erhöhten Sitzstangen wurden nur zu einem sehr geringen Anteil während des Tages frequentiert, was möglicherweise auf ein ungünstiges Design, ungenügende Abteilhöhe (Mindesthöhe von 45 cm nach EU-Richtlinie) sowie auf die Positionierung innerhalb der Abteile zurückzuführen ist.

RÖNCHEN *et al.* 2010. Use of functional areas, perch acceptance and selected behavioural traits in three different layer strains kept in furnished cages, small group systems and modified small group systems with elevated perches. *Arch Geflügelk* 74:256-264.

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Entwicklung der „Celler Kleinvoliere“ für Legehennen

Das Ziel der Untersuchung war es, ein Haltungssystem für Legehennen zu entwickeln, in dem kleine Hennengruppen bei deutlicher Trennung von „Aktivitäts-“ und „Ruhebereich“ und formal entsprechend den gesetzlichen Richtlinien für Bodenhaltung gehalten werden können. Die „Celler Klein-

voliere" (KV) zeichnet sich durch zwei Ebenen aus. Auf der unteren Ebene befinden sich der Einstreubereich, das Nest, der Trog sowie Tränken. Die obere Ebene können die Hennen durch Flattern vom Einstreubereich aus erreichen. In diesem „Ruhebereich“ befinden sich Sitzstangen und Tränken. In drei Durchgängen über jeweils 12 Monate wurde in verschiedenen Varianten insbesondere die Nutzung der Funktionsbereiche untersucht. Die Nutzung der Funktionsbereiche war mit den aus der Boden- und Volierenhaltung bekannten Werten vergleichbar. So hielten sich beispielsweise zwischen 20 % und 25 % der Hennen tagsüber im Einstreubereich auf und die mittlere Dauer des Staubbadens betrug 19 Minuten. Nachts befanden sich auf den Sitzstangen der oberen Ebene etwa 70–85 % der Hennen und weitere 16–26 % der Hennen nutzten den Trog oder, ab Durchgang 2, die zusätzlich über dem Trog angebrachte Sitzstange zum nächtlichen Ruhen. Als besonders vorteilhaft könnte sich eine Variante mit auf dem Kotband der unteren Ebene integriertem Einstreubereich erweisen, da sich hiermit der Wechsel der Einstreu und das Sammeln verlegter Eier automatisieren ließe.

SCHRADER, L. 2010. Entwicklung der „Celler Kleinvoliere“ für Legehennen. KTBL-Schrift 482:196–206, (ISBN 978-3-941583-41-2)

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Einfluss von Brutfaktoren auf das Verhalten von Masthühnern

Untersucht wurde an zwei Masthuhn-Herkünften die Nahrungsaufnahme während der ersten Lebenswoche in Abhängigkeit vom Zeitpunkt ihres Schlupfes. Die Küken einer langsam (La Bresse) und einer schnell (Ross 308) wachsenden Herkunft wurden entsprechend ihres Schlupfzeitpunktes (zu Beginn, in der Mitte, am Ende des Schlupfes) drei Gruppen zugeordnet. Die Tiere wurden in nach Herkunft getrennten Gruppen gehalten und an den ersten sechs Lebenstagen wurden Verhaltensbeobachtungen durchgeführt. Erfasst wurde der Anteil fressender (vom Trog oder vom Kükenpapier), trinkender oder anders aktiver Tiere. Bei den spät geschlüpften Küken der langsam wachsenden Herkunft wurde eine höhere Mortalität durch sogenannte „Rückenfäller“ beobachtet.

Der Anteil Küken, der Nahrungsaufnahme zeigte, war für beide Herkünfte vergleichbar, aber die Tiere der langsam wachsenden Herkunft begannen später vom Kükenpapier zu fressen und wurden weniger beim Fressen aus dem Trog beobachtet als die Küken der schneller wachsenden Herkunft. Letztere waren wiederum weniger aktiv, vor allem wenn sie der frühen und mittleren Schlupf-Gruppe angehörten. Früh geschlüpfte Küken fraßen mehr vom Kükenpapier als Küken aus der Mitte oder dem Ende des Schlupfes. Innerhalb der Herkünfte zeigte sich kein Effekt des Schlupfzeitpunktes auf das Lebendgewicht beim Schlupf, aber das Fressverhalten von früh geschlüpften Küken führte zu einem kleinen, vorübergehenden Gewichtsvorteil am dritten Lebenstag.

NIELSEN *et al.* 2010. Feeding activity in groups of newly hatched broiler chicks: Effects of strain and hatching time. *Poultry Sci* 89:1336–1344.

Aarhus University, Tjele (Dänemark); Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Verhaltensprobleme beim Geflügel: Federpicken und Kannibalismus

Die Verhaltensprobleme Federpicken und Kannibalismus stellen nach wie vor ein großes Problem in der Haltung von Legehennen dar. Da es sich beim Federpicken und Kannibalismus um ein sehr komplexes Verhaltensproblem handelt, das durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird, sind einfache Lösungen nicht möglich. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass dieses Verhaltensproblem eine geringe bis moderat hohe Heritabilität hat. Daher wurden Linien auf ihre Neigung zu Federpicken selektiert, um Zusammenhänge zwischen Federpicken und physiologischen, genetischen und anderen Verhaltensmerkmalen zu untersuchen. Durch die Selektion auf Federpicken änderten sich auch andere Eigenschaften der Hennen. Bei den Leistungsmerkmalen zeigten sich bei Hennen, die auf geringe Neigung zum Federpicken selektiert wurden, im Vergleich zu einer nicht selektierten Kontrolllinie keine Unterschiede hinsichtlich der Eizahl, dem Eigewicht, der Eimasse und der Schalendicke. Die Höhe des Eiklars, der Eigelbanteil und der Futterverbrauch nahmen jedoch ab. Bei Hennen der Linie, die auf hohe Neigung zum Federpicken selektiert wurde, blieben die Eimasse, die Höhe des Eiklars, der Eigelbanteil und der Futterverbrauch unverändert. Allerdings nahm die Eizahl ab und das Eigewicht sowie die Schalendicke nahmen zu. Aufgrund der Vielzahl von Einflussfaktoren ist eine interdisziplinäre Herangehensweise notwendig, um neben genetischen Ansätzen auch die Aufzuchtbedingungen und die Haltung so den Tieren anzupassen, dass diese Verhaltensprobleme möglichst weit reduziert werden.

Wysocki *et al.* 2010. Genetic and physiological factors influencing feather pecking in chickens. *World's Poultry Sci J* 66:659–671

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT; Universität Hohenheim, Stuttgart (beide Deutschland); Aarhus University (Dänemark);

Bedeutung von Sp1 und Sp3 für die Expression des GAS41-Gens

Das „Glioma-Amplified Sequence“ (GAS) 41-Gen kommt als multiple Kopie in einigen Hirntumoren (Glioblastomen und Astrozytomen) vor. GAS41 ist notwendig für die Unterdrückung des Tumorsuppressors p53. Es wird vermutet, dass GAS41 unter Einfluss bestimmter Stressoren verstärkt exprimiert wird und somit an der neuronalen Tumorgeneese beteiligt ist. In dieser Studie wurde die Regulation des GAS41-Gens untersucht, wobei die Interaktion von Transkriptionsfaktoren im Vordergrund stand. Zusammenfas-

send konnte gezeigt werden, dass der GAS41-Promotor mit einem bereits früher identifizierten Replikationsursprung co-lokalisiert ist und durch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 aktiviert wird. Es ist bereits bekannt, dass Sp1 auch bei der viralen Replikation eine große Rolle spielt.

HÜBNER, K. AND L. PHI VAN. 2010. Sp1 and Sp3 regulate transcription of the chicken GAS41 gene. *Biochim Biophys Acta* 1799:442-447. Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

7.2 SCHWEINEHALTUNG

Entwicklung einer Aufrufstation zur Verringerung sozialer Auseinandersetzungen bei tragenden Sauen

Die Haltung von tragenden Sauen ist oft von einer reizarmen Haltungsumwelt und wenig positiven senso-motorischen Stimulationen gekennzeichnet. Hinzu kommen Rangordnungskämpfe in der Gruppenhaltung und Aggressionen vor der Futterstation durch restriktive Kraftfutterfütterung. In einem Verbundprojekt, das gemeinsam mit dem Forschungsbereich Verhaltensphysiologie des Leibniz Instituts für Nutztierbiologie Dummerstorf (FBN) sowie der Fa. PigTek, Schüttdorf, durchgeführt wurde, wurde ein neues Fütterungssystem für trächtige Sauen in Gruppenhaltungen entwickelt und getestet, um Verbesserungen in der Tiergerechtigkeit und somit auch Tiergesundheit zu erreichen. Ziel der Entwicklung war es, Sauen einzeln mittels eines individuellen akustischen Signals zur Futterstation zu rufen, um somit die sozialen Auseinandersetzungen vor der Station zu reduzieren und die Fütterung für jede Sau vorhersehbar zu machen.

Zunächst wurde in Vorversuchen am FBN getestet, ob adulte Sauen in der Lage sind, individuelle akustische Signale mit der Fütterung zu assoziieren und es lernen, nach „Aufruf“ eine Futterstation zu betreten. Als akustische Signale wurden dreisilbige Namen verwendet. Die Sauen wurden in kleinen Gruppen in einer Trainingsphase zunächst klassisch konditioniert, d. h. sie bekamen ihren Namen vorgespielt, wenn sie spontan die Futterstation betreten hatten. Nach der Trainingsphase konnten die Sauen die Futterstation nur noch betreten, wenn sie vorher mit ihrem Namen gerufen wurden. Die Sauen lernten schnell die ihnen gestellte Aufgabe. Dabei zeigte sich, dass Sauen mit höherem sozialem Rang das Lernkriterium schneller erfüllten als Sauen mit niedrigerem Rang. Dies war nicht etwa auf ein schlechteres Lernvermögen rangniederer Sauen zurückzuführen, sondern darauf, dass gerade zu Beginn der Trainingsphase die ranghohen Sauen den Zugang zur Station häufig blockierten.

Um zu testen, ob die Aufruffütterung auch in größeren, praxisüblichen Sauengruppen eingesetzt werden kann und ob es hierdurch zu einer Verringerung sozialer Auseinandersetzungen kommt, wurden am FLI insgesamt 70 Sauen

auf einen individuellen Namen konditioniert. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit herkömmlicher Abruffütterung zeigte sich, dass bei der Aufruffütterung die Anzahl sozialer Auseinandersetzungen deutlich auf etwa ein Drittel reduziert werden konnte. Insgesamt waren auch weniger Sauen in die Auseinandersetzungen involviert. Infolgedessen wurden bei der Aufruffütterung auch weniger Läsionen und Wunden der Haut festgestellt.

MANTEUFFEL *et al.* 2010. Social hierarchy affects the adaption of pregnant sows to a call feeding learning paradigm. *Appl Anim Behav Sci* 128:30-36

KIRCHNER *et al.* 2010. Können mit einer Aufrufstation für Wartesaunen agonistische Interaktionen gesenkt werden? *KTBL-Schrift* 482:127-136. (ISBN 978-3-941583-41-2)

Leibniz Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf; Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

8 ZÜCHTUNG UND GENETISCHE RESSOURCEN

8.1 MONITORING, CHARAKTERISIERUNG UND ERHALTUNG TIERGENETISCHER RESSOURCEN

Sowohl molekulargenetische als auch quantitativ genetische Methoden kommen beim Monitoring, der Charakterisierung und Erhaltung tiergenetischer Ressourcen zum Einsatz.

Zur Klassifizierung tiergenetischer Ressourcen bei landwirtschaftlichen Nutztieren stehen vor allen Dingen molekulargenetische Techniken im Mittelpunkt. Neben der Prüfung unterschiedlicher Markerarten (Mikrosatelliten, SNPs) und Informationsquellen (genomische DNA, mitochondriale DNA) nutzen wir neue Ansätze zur Schätzung genetischer Ähnlichkeiten zwischen Rassen und Populationen. Das Management genetischer Ressourcen bedarf sowohl des Monitorings von Populationen als auch der züchterischen Bearbeitung aufgrund von Einzeltierinformationen. Diesem Ziele dienen methodische Arbeiten zur Informationserfassung, -speicherung und -verarbeitung sowie der statistischen Analyse. Wo möglich werden generalisierte Verfahren entwickelt und in allgemein nutzbare Software implementiert.

Genetische Diversität bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Während der Domestikation und Ausbreitung von Haustieren in verschiedene Regionen der Erde haben Isolation, Drift und Selektion zu einer großen Rassenvielfalt innerhalb von Arten geführt. Im Rahmen des EU-Projektes GLOBAL-DIV wurden aktuelle Ergebnisse der Charakterisierung genetischer Ressourcen in einem Überblicksartikel zusammengestellt. Inhaltlich stützen sich die Methoden dabei auf die demographische Charakterisierung, die Aufnahme von Produktionsumgebungen und effektives Datenmanagement. Darüber hinaus ermöglichen molekulargenetische Studien einen Vergleich der genetischen Vielfalt innerhalb und zwischen den Rassen und die Rekonstruktion der Entwicklungsgeschichte der Rassen und Populationen. Neue Einblicke in die Funktion und Bedeutung genetischer Vielfalt sind von Fortschritten in molekularen Technologien zu erwarten.

GROENEVELD *et al.* 2010. Genetic diversity in farm animals; a review. *Anim Genet* 41(s1):6-31.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING (Deutschland); University of Utrecht; Animal Evaluations Unit - CRV, Arnhem (beide Niederlande); Universidad Politécnica de Madrid (Spanien); Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome; Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza (alle Italien); Trinity College, Dublin (Irland); Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing, (China); GLOBALDIV Consortium

Nutzung molekularer Marker zur Charakterisierung genetischer Diversität beim Haushuhn

In einer mehrjährigen Studie, die nun abgeschlossen werden konnte, wurden lokale Haushuhnrasen Vietnams mit Hilfe von Mikrosatelliten auf der autosomalen Ebene und Sequenzpolymorphismen auf der mitochondrialen Ebene analysiert. Die untersuchten neun vietnamesischen Rassen stammen offensichtlich von mehreren mütterlichen Pfaden ab, die ihren Ursprung in Gebieten Süd- und Südwest-China und angrenzenden Regionen haben. Anhand der autosomalen Marker ließen sich drei dieser Rassen als isolierte Gruppen identifizieren. Diese Gruppierung steht in Bezug zur geographischen Verteilung in Vietnam und weist auf eine lange eigenständige Entwicklungsgeschichte dieser Rassen hin.

CUC *et al.* 2010. Assessing genetic diversity of Vietnamese local chicken breeds using microsatellites. *Anim Genet* 41:545-547.

CUC *et al.* 2010. Multiple Maternal Lineages of Vietnamese Local Chickens Inferred by Mitochondrial DNA D-loop Sequences. *Asian-Aust J Anim Sci* (im Druck)

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Georg-August-Universität Göttingen; Fachhochschule Bingen (alle Deutschland); National Institute of Animal Husbandry, Hanoi (Vietnam)

Schätzung der effektiven Populationsgröße auf Basis molekularer Marker

Im Rahmen einer Kooperation wurde ein von der DFG gefördertes Projekt abgeschlossen, dessen Ziel es war, die

Methodik der Schätzung der effektiven Populationsgröße auf Basis molekularer Marker anhand der Homozygotie von Chromosomensegmenten weiterzuentwickeln. Hierzu wurden an drei experimentellen Hühnerlinien des FLI und zwei kommerziellen Linien molekulare Typisierungen durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass eine begrenzte Anzahl Mikrosatellitenloci definierter Chromosomensegmente keine hinreichend genaue Schätzung der effektiven Populationsgröße erwarten lässt. Demgegenüber war dies auf Basis von mehreren Tausend SNPs möglich. Es wurde eine Methode vorgeschlagen, die das stark unterschiedliche Verhältnis von physischer zu genetischer Länge zwischen Chromosomen in der Ne-Schätzung berücksichtigt. Im Rahmen des Projekts wurde die erste genomweite Analyse der LD-Struktur im Genom verschiedener Legehennenpopulationen durchgeführt.

QANBARI *et al.* 2010. Linkage disequilibrium reveals different demographic history in egg laying chickens. *BMC Genetics* 11:103.

Georg-August-Universität, Göttingen; Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven

Zum routinemäßigen Monitoring landwirtschaftlicher Nutztierpopulationen

Die Erhaltung genetischer Vielfalt landwirtschaftlicher Nutztiere fußt zweckmäßigerweise auf der Berechnung populationsgenetischer Maßzahlen wie der Inzuchtsteigerung und der effektiven Populationsgröße. Diese und andere Parameter der Populationsdynamik lassen sich prinzipiell aus den Abstammungsnachweisen, d. h. den Pedigrees der Zuchttiere einer Population berechnen. Ein regelmäßiges Monitoring von Zuchtpopulationen setzt ein einfach zu handhabendes und robustes Verfahren voraus. Mit der Entwicklung des Webdienstes "PopRep", das weltweit frei unter poprep.tzv.fal.de zugänglich ist, wurde diese Voraussetzung geschaffen. Nachdem der Nutzer sein Pedigree hochgeladen hat, werden nach umfangreichen Berechnungen zwei Populationsberichte im PDF Format an die Nutzer per email zurückgeschickt. Optional werden auch tierindividuelle Inzuchtcoeffizienten sowie alle numerischen Daten der Berichtstabellen dem Nutzer vollautomatisch zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Inzwischen wird der Webdienst weltweit regelmäßig in Anspruch genommen mit den Schwerpunkten der Nutzung in den Americas und Europa, aber auch Fernost.

Die Ergebnisse können sowohl für das Monitoring als auch zum Populationsmanagement genutzt werden.

GROENEVELD, E. 2010. Pedigree basiertes Management und Monitoring genetischer Vielfalt in Zuchtpopulationen. *Züchtungskunde* 82:29-39

KEHR *et al.* 2010. Untersuchungen zu einem Monitoring genetischer Diversität bei Nutztierassen: Ergebnisse zum Roten Höhenvieh. *Züchtungskunde* 82:387-399

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; HTW Dresden; LfULG Sachsen, Köllitsch

Ein integriertes Netzwerk von dezentralen Datenbanken für Biodiversitäts- und Genbanken (EFABISnet)

Das EFABISnet Projekt wird von der EU (co)finanziert und von der Europäischen Vereinigung für Tierzuchtwissenschaften (EVT) koordiniert. Als weitere Partner sind Deutschland, Italien, Estland, Slowakei, Slowenien, Irland, Zypern, Niederlande, Finnland, Großbritannien, Österreich, Island, Georgien und die Schweiz beteiligt. In der ersten Phase wurde ein Netzwerk aus nationalen Datenbanken zum Monitoring genetischer Ressourcen etabliert. Im letzten Projektjahr 2010 wurde dieses Netzwerk auf 17 Europäische Länder erweitert mit jetzt 16 EFABIS und 13 CryoWEB Installationen. Mit CryoWEB als einer Web-basierten Datenbank zur Dokumentation nationaler Genbankkollektionen von kryogenem Material landwirtschaftlicher Nutztiere ist somit ein erster Schritt in Richtung eines vereinheitlichten Registers von Genbanken in Europa getan.

DUCHEV *et al.* 2010. CryoWEB: Web software for the documentation of the cryo-preserved material in animal gene banks. *Bioinformatics* 5:219-220, ISSN 0973-2063

DUCHEV *et al.* 2010. CryoWEB – User's Guide and Reference Manual. Applications in Biodiversity Informatics. Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institute of Farm Animal Genetics. ISBN 978-3-9813280-0-4

Friedrich-Loeffler-Institut, ING (Deutschland); Università degli Studi di Milano (Italien); Institute of Organic Farming and Biodiversity of Farm Animals, Thalheim (Österreich); Wageningen University and Research Centre, Lelystad (Niederlande); MTT Agrifood Research, Jokioinen (Finnland); University of Ljubljana, Domzale (Slowenien); The Farmers Association of Iceland, Reykjavik (Island); Animal Production Research Centre Nitra, Lužianky, (Slowakei); Bundesamt für Landwirtschaft (BLW), Bern (Schweiz); Estonian University of Life Sciences, Tartu (Estland)

MolabIS – ein System zum effektiven Management von molekulargenetischen Daten in Biodiversitätslabors

Sowohl die Verwaltung von Proben sowie experimenteller Ergebnisse als auch die Zusammenstellung für weiterführende Analysen sind essentielle Aufgaben molekulargenetisch arbeitender Labore im Bereich der Biodiversitätsforschung. Im Rahmen dieses durch das BMBF geförderten Projekts wurde eine Web-basierte Datenbankapplikation zusammen mit bioinformatoren Werkzeugen entwickelt. Das MolabIS fungiert als integriertes Informationssystem zum Management von Mikrosatelliten- und Sequenzdaten. Der Nutzer kann Daten eintragen, die im Zuge des Arbeitsflusses anfallen, oder auch Batchladen von Proben sowie molekulare Informationen und Rohergebnissen verschiedener Sequenzierer durchführen. Such- und Updatefunktionen sowie Reporterstellung sowie der Export von Daten in verschiedene Formate stehen zur Verfügung. Die Software ist unter den Lizenzbedingungen der GPL frei verfügbar auf der Website <http://www.molabis.org>.

CONG, T.V.C. AND E. GROENEVELD. 2010 MolabIS – an Open Source Information System for Sequencing and Genotyping Workflows. 9th

World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Abstracts, Leipzig, Germany, August 1 to 6, S. 136

Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Genotyp-Umwelt-Interaktionen bei Mastleistungs- und Schlachtkörpermerkmalen verschiedener Schweinerassen in konventioneller und ökologischer Erzeugung

In der ökologischen Schweineproduktion wird immer wieder über die spezielle Eignung alter und moderner Schweinerassen sowie die Notwendigkeit eigener Zuchtprogramme diskutiert. Es wird angenommen, dass auf Grund von Genotyp-Umwelt-Interaktionen Leistungspotenziale von Schweinen aus konventionellen Zuchtprogrammen durch ökologische Produktionsbedingungen nicht ausgeschöpft werden. Daher wurden Mastschweine von sieben merkmalsdifferenzierten Genotypen auf zwei Leistungsprüfungsanstalten in jeweils ökologischer und konventioneller Haltung auf Merkmale der Mastleistung und der Schlachtkörperqualität geprüft. Hinsichtlich der ökonomisch wichtigen Kriterien der Mastleistung und Schlachtkörperqualität sind moderne Genotypen den alten Rassen auch bei ökologischer Fütterung und Haltung überlegen. Daraus kann gefolgert werden, dass für die ökologische Schweineproduktion keine eigenständigen Zuchtprogramme entwickelt werden müssen.

BRANDT *et al.* 2010. Genotype-environment interactions for growth and carcass traits in different pig breeds kept under conventional and organic production systems. *Animal* 4:535-544.

Universität Gießen; Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Landwirtschaftskammer Niedersachsen; Johann Heinrich von Thünen-Institut, Westerau

8.2 BIOTECHNOLOGIE

Die Biotechnologie eröffnet vielversprechende Perspektiven für eine kostengünstige, qualitätssichernde und verbessernde, nachhaltige und diversifizierte Tierproduktion. Im Vordergrund der Arbeiten stehen die Entwicklung neuer Verwendungs- und Nutzungsformen für landwirtschaftliche Nutztiere, die Aufklärung molekularer Regelmechanismen in der Embryonalentwicklung, Klonen, die Trennung von X- und Y-Spermien, sowie die bio- und molekulargenetische Analyse genetischer Diversität. Die multidisziplinären Arbeiten integrieren neueste Erkenntnisse aus dem embryologischen, reproduktions- und zellbiologischen und molekulargenetischen Methodenspektrum.

Untersuchungen zur Entwicklungsfähigkeit boviner Oozyten und Embryonen

Bovine Oozyten können einfach aus Schlachtovarien oder über ultraschallgeleitete Follikelpunktion von lebenden Tieren gewonnen werden. Diese Oozyten können nach einer

In-vitro-Reifungsphase *in vitro* fertilisiert und bis zu transfertauglichen Embryonen kultiviert werden. Damit können ausreichend Oozyten und Embryonen für experimentelle Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Die bovine Oozyten- und Embryonalentwicklung dient zunehmend auch als Modell für die humane Oozyten- und Embryonalentwicklung, was im Zusammenhang mit den sogenannten assistierten Reproduktionstechniken von zunehmender Bedeutung ist. Wir haben dazu verschiedene Studien durchgeführt; über drei davon soll im Folgenden berichtet werden. In der ersten Studie wurden bovine Oozyten als Modell genommen, um mögliche epigenetische Veränderungen an drei dem Imprinting unterliegenden Genen in Abhängigkeit von der Reifung (2 verschiedene *In-vitro*-Reifungsverfahren, *In-vivo*-Reifung) zu untersuchen. Dazu wurde eine modifizierte Bisulfit-Sequenzierungsmethode entwickelt, die die Analyse des Methylierungsprofils individueller Allele für die drei Gene H19/IGF2, PEG3 und SNRPN ermöglichte. Diese Gene sind bei Maus und Mensch häufig mit Imprinting-Defekten verbunden und auch in Rinderembryonen differentiell methyliert. Insgesamt war der Anteil individueller CpGs und gesamter Allele mit Methylierungsfehlern zwischen den beiden *In-vitro*-Reifungsverfahren und der *In-vivo*-Gruppe nicht unterschiedlich. Dies zeigt, dass die aktuellen Reifungsprotokolle keine oder nur wenige Auswirkungen auf diese kritischen epigenetischen Punkte haben. Eine weitergehende Analyse des Genexpressionsprofils ergab Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* gereiften Oozyten, was in Teilen darauf hindeutet, dass neben der DNA-Methylierung auch andere Regulationsmechanismen die mRNA Expression beeinflussen können.

In der zweiten Studie wurde untersucht, in wie weit eine hohe Konzentration an Insulin-like Growth Factor 1 (IGF 1) die Embryonalentwicklung beeinflussen und in wie weit die bovine *In-vitro*-Entwicklung als Modell für das Studium des polyzystischen Ovarsyndroms (PCOS) beim Menschen dienen kann. Bovine Embryonen wurden entweder in einer physiologischen (100 ng/ml) oder supraphysiologischen (1000 ng/ml) Konzentration IGF1 inkubiert. Die Zuordnung der Zellen zum Trophoblasten oder zur Inneren Zellmasse (ICM), der Anteil von Apoptose und die Expression von mRNA Transkripten und Protein für ausgewählte Gene wurden untersucht. Die Gene waren insbesondere an der Regulation der Apoptose oder des IGF-Systems beteiligt. Die supraphysiologische IGF1 Konzentration verbesserte die Blastozystenbildung gegenüber den Kontrollen, war sowohl mit einem höheren Anteil an Apoptose als auch mit einer reduzierten TP53 Protein Expression im Trophectoderm verbunden. Die Anzahl der Zellen in der ICM wurde aber gesteigert, was mit einem Anstieg an IGF1 Receptor Protein in der ICM korrelierte. Ein geringer, aber signifikant erhöhter Anteil an Blastozysten zeigte eine Hypertrophie der ICM, die in den Kontrollen und in den Embryonen aus Kultur mit der physiologischen Konzentration von IGF1 nicht beobachtet wurde. Die physiologische IGF1 Konzentration erhöhte die Expres-

sion für IGF1 Receptor Protein und für IGF Binding Protein 3, was insgesamt zu einer erhöhten Blastozystenrate führte, ohne dass die Gesamtzellzahl oder der ICM Anteil erhöht waren. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese von nachteiligen Effekten supraphysiologischer IGF1 Konzentrationen in der frühen Trächtigkeit. Jedoch unterstützen sie nicht die bisherige Hypothese, dass der erhöhte Apoptoseanteil bedingt durch eine exzessive IGF1 Konzentration durch eine Downregulation des IGF1 Receptors verursacht wird, wie das in Mausembryonen beschrieben wurde. Das *In-vitro*-System kann als Modell für weitergehende mechanistische Studien für PCOS Patienten verwendet werden.

In der dritten Studie wurde rekombinantes humanes IGF1 in die Ovarien von präpuberalen und postpuberalen Rindern injiziert, um die Effekte auf die Entwicklungskompetenz der Oozyten, das Expressionsprofil von 6 entwicklungsrelevanten Genen zu untersuchen und die Beziehung zur Apoptose festzustellen. Die Oozyten wurden von 7 – 10 Monate alten präpuberalen Milchkälbern, 11 – 18 Monate alten postpuberalen Färsen sowie von erwachsenen Kühen über ultraschallgeleitete Follikelpunktion gewonnen. Die gewonnenen Oozyten wurden *in vitro* gereift, fertilisiert und bis zu Blastozysten kultiviert. Apoptose wurde mit Hilfe des TUNEL-Assays ermittelt. Die IGF1 Behandlung hatte keine Auswirkungen auf die Blastozystenrate bei präpuberalen Tieren und bei Färsen. Das Expressionsprofil der 6 Gene wurde wesentlich durch Alter und IGF1 Behandlung beeinflusst. Das Apoptoseausmaß korrelierte mit dem Alter der Oozytenspender und war in Blastozysten, die aus Oozyten von präpuberalen Kälbern produziert wurden, am höchsten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Apoptose ein kritisches Merkmal in der Erlangung der Entwicklungskompetenz von Oozyten ist, die von präpuberalen Tieren gewonnen werden, und dass eine IGF1 Behandlung die Entwicklungspotenz solcher Oozyten nicht positiv beeinflusst.

HEINZMANN *et al.* 2011. Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 78:188-201.

Velazquez *et al.* 2011. Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction* 141:91-103

ZARAZA *et al.* 2010. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation *in vitro*-produced embryos from prepuberal and postpuberal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. *Theriogenology* 74:75-89.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Julius Maximilians Universität, Würzburg; Tierärztliche Hochschule Hannover; Johannes Gutenberg Universität, Mainz (alle Deutschland); Universidad Autonoma de Campeche (Mexico); Universidad Centroccidental „Lisandro Alvarado“, Barquisimeto (Venezuela)

Lutealer Blutfluss als Indikator für die Lutealfunktion beim Rind

In einer Studie wurde die Eignung des lutealen Blutflusses, gemessen über Farbdopplersonographie untersucht, um die Lutealfunktion während des Zyklus von Milchkühen zu

untersuchen. Insgesamt wurden 14 aufeinander folgende sonographische Untersuchungen in 10 synchronisierten laktierenden Holstein Friesian Kühen an den Tagen 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, -5, -4, -3, -2, -1 des Zyklus durchgeführt (Tag 1 = Ovulation). Die Größe des Gelbkörpers wurde mit Hilfe einer sonographischen Messung des maximalen Durchmessers festgestellt. Der Blutdurchfluss wurde anhand des maximal kolorierten Gebiets des *Corpus luteum* in den dopplersonographischen Bildern berechnet. Die Größe des *Corpus luteum* verdoppelte sich in der lutealen Wachstumsphase von Tag 7 und blieb auf diesem hohen Level während der Lutealphase an Tag 8 – 16; danach kam es zu einem langsamen Abfall. Der luteale Blutfluss verdoppelte sich während der Wachstumsphase, verdoppelte sich weiter während der statischen Lutealphase und fiel dann schnell während der lutealen Regression ab. Danach kann der luteale Blutfluss als ein zuverlässiger Marker für den lutealen Status herangezogen werden. Mit Hilfe des lutealen Blutflusses konnte zudem zuverlässig der Progesteronspiegel oberhalb von 1,0 ng/mL abgeschätzt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Messungen des lutealen Blutflusses die Lutealfunktion besser analysiert werden kann als die Größe des *Corpus luteum* bisher ermöglichte.

HERZOG *et al.* 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 73:691-697.

Tierärztliche Hochschule Hannover; Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Technische Universität München, Freising

Untersuchung zur Modulation der Telomeren in bovinen Embryonen

Die Telomeren sind die Kappenstrukturen an den Chromosomen, die für deren Stabilität essentiell sind. Das Enzym Telomerase ist in Keimzellen aktiv und darüber hinaus essentiell für die Aufrechterhaltung der Telomerenlänge über die Generationenabfolge. In präimplantativen Säugerembryonen wird Telomeraseaktivität erstmals im Morulastadium gefunden und ist mit dem Anstieg der Telomerenlänge im Blastozystenstadium verbunden. In einer kürzlich abgeschlossenen Studie konnten wir zeigen, dass die Telomerenlänge sowohl bei Maus- als auch bei Rinderblastozysten zwischen den beiden Zellkompartimenten (Trophectoderm oder Innerer Zellmasse) unterschiedlich sind. In Mausembryonen war die Aktivität höher im Trophectoderm und geringer in der inneren Zellmasse, während dies beim Rinderembryo umgekehrt war. Durch ectopische Expression (nach zytoplasmatischer Injektion) von humaner Telomerase reverse Transcriptase (human *TERT*) in bovinen Embryonen kam es zu einem Anstieg der Telomerase Aktivität, die wiederum die Telomerenlänge erhöhte. Diese transiente Expression von humanem *TERT* konnte auf 4- bzw. Morula Zellstadien beschränkt werden, durch Verwendung Cytosinmethylierter oder nichtmethylierter Plasmide. Diese Daten zeigen erstmals, dass durch Expression von humanen *TERT*-

Konstrukten die funktionale Telomerase Expression erhöht wird und dies wiederum zur Verlängerung der Telomeren führt. Damit ist eine wichtige Grundlage für ein Modell geschaffen, in dem die Auswirkungen der Telomerenverlängerung auf die Embryonalentwicklung studiert werden können und das Rind möglicherweise als ein Großtiermodell für Studien zur Telomeren-Regulation und Alterung verwendet werden kann.

IQBAL *et al.* 2010. Species-Specific Telomere Length Differences Between Blastocyst Cell Compartments and Ectopic Telomere Extension in Early Bovine Embryos by Human Telomerase Reverse Transcriptase. *Biol Reprod* [Epub ahead of print; doi:10.1095/biolreprod.110.087205].

Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Oct4-GFP transgene Schweine als neues Tiermodell für Reprogrammierungsstudien

Das Hausschwein ist ein wichtiges Modell für die Entwicklung neuer chirurgischer Techniken, die Entwicklung der Xenotransplantation oder für die Schaffung neuer Krankheitsmodelle sowie für die präklinische Prüfung neuer Zelltherapien. Keimbahngängige pluripotente Stammzellen sind bei dieser Spezies jedoch noch nicht berichtet worden. Dies ist ein wesentliches Hindernis in der genetischen Modifikation von Schweinen. Der Transkriptionsfaktor Oct4 ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und für die Reprogrammierung somatischer Zellen in einen pluripotenten Zustand. Wir haben transgene Schweine produziert, die ein 18 kb großes genomisches Konstrukt mit dem murinen Oct4 Promoter und der EGFP cDNA tragen. Dies erlaubt die Identifizierung pluripotenter Zellen durch den Nachweis der EGFP Fluoreszenz. Mehrere transgene Schweine wurden mit Hilfe des somatischen Kerntransfers produziert und im Detail charakterisiert. Expression des EGFP Reporter Konstrukt war in Keimbahnzellen, in Blastozysten sowie in Keimzellen im Hoden zu finden. Das Konstrukt wurde an die Nachkommen entsprechend den Mendelschen Regeln weitergegeben und erlaubt dadurch eine Linienzucht. Die Reprogrammierung von Fibroblasten von diesen Tieren durch Fusion mit pluripotenten murinen embryonalen Stammzellen oder über virale Transfusion mit den 4 humanen Faktoren Oct4, SOX2, KLF4 und c-MYC führte zur Oct4-EGFP Reaktivierung und EGFP Expression. Diese transgenen Schweine sind somit ein wichtiges neues Hilfsmittel für Reprogrammierungsstudien und für die Ableitung pluripotenter Schweinezellen. Sie können darüber hinaus eine große Rolle als Großtiermodell für die Entwicklung neuer Zelltherapien spielen.

NOWAK-IMIALEK *et al.* 2010. Oct 4-Enhanced Green Fluorescent Protein Transgenic Pigs: A New Large Animal Model for Reprogramming Studies. *Stem Cells and Development* [Epub ahead of print; doi: 10.1089/scd.2010.0399].

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Rebirth Center of Excellence, Medizinische Hochschule Hannover; Max Planck Institut für Molekulare Biomedizin, Münster

Geschlechtsspezifische Beeinflussung der Embryonalentwicklung bei Befruchtung mit gesextem Bullensperma

Gesextes Bullensperma wird international vermarktet und länderabhängig unterschiedlich stark nachgefragt. In diesem Projekt sollen u. a. geschlechtsspezifische Aspekte bei Befruchtung und Embryonalentwicklung nach Belegung mit gesextem Sperma untersucht werden. Blastozysten wurden nach *In-vitro*-Reifung von Oozyten *in vitro* befruchtet (IVF) und bis zur Blastozyste entwickelt. Die Teilungsraten waren zwischen X- und Y-chromosomal befruchteten Oozyten gleich, aber sie lagen deutlich unter den Fertilisierungsergebnissen mit ungesextem Sperma. Für 9 Gene wurde die mRNA Menge in Blastozysten bestimmt. Zwar wurde ein Unterschied zwischen Embryonen aus gesextem und ungesextem Sperma nicht festgestellt, aber für drei Gene wurden geschlechtsspezifische Unterschiede erkannt.

Der Anteil mixoploider Embryonen betrug 80 % und unterschied sich nicht signifikant zwischen den Embryonen nach Befruchtung mit X- bzw. Y-chromosomalen Spermien sowie der Kontrollgruppe mit ungesextem Sperma. Der Anteil polyploider Embryonen betrug 1,6 % (X) 5,6 % (Y) und 6 % (unsortiert).

Obwohl die autosomalen Chromosomen in männlichen und weiblichen Embryonen identisch sind, weisen sie geschlechtsspezifische Transkriptionsmuster auf. Um die geschlechtsspezifischen Differenzen auf mRNA Ebene darzustellen, wurde in einem DNA-Microarray die Genexpression in neun Gruppen bei 60 IVF-Blastozysten für das jeweilige Geschlecht untersucht. Etwa ein Drittel der Transkripte zeigte einen geschlechtsabhängigen Dimorphismus. Dies deutet darauf hin, dass ohne den Einfluss von Hormonen von den Geschlechtschromosomen eine starke Einflussnahme auf die Transkriptionsregulation der Autosomen besteht. Rund ein Drittel der Transkripte zeigte einen geschlechtsabhängigen Dimorphismus. Dass diese Geschlechtsabhängigkeit nicht durch das *In-vitro*-System bedingt ist, wurde durch Vergleichsuntersuchungen mittels qPCR an 6 Genen, die aus *in vivo* produzierten Blastozysten stammten und einen vergleichbaren Dimorphismus aufwiesen, bestätigt. Ein homologes Gen zu einem X-gebundenen Gen, das am Spliceosomaufbau beteiligt ist, wurde auf dem Y-Chromosom gefunden. Die meisten X-Chromosom exprimierten Transkripte waren in weiblichen Blastozysten hochreguliert; allerdings nur um das 1,6-fache, was darauf hindeutet, dass die X-Chromosom-Inaktivierung im Blastozystenstadium nur teilweise erfolgt.

GARCIA-HERREROS *et al.* 2010. Incidence of chromosomal abnormalities in bovine blastocysts derived from unsorted and sex-sorted spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 22:1272-1278.

BERMEJO-ALVAREZ *et al.* 2010. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3394-3399.

BERMEJO-ALVAREZ *et al.* 2010. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced *in vitro* with sex-sorted spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 22:426-436.

University College Dublin (Irland); Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zootécnicos, INIA, Madrid (Spanien); Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Verwendung von Gold-Nanopartikeln (GNP) zur funktionellen Markierung spezifischer DNA-Sequenzen

Goldnanopartikel (AuNP) besitzen interessante optische Eigenschaften wie hohe Quantenausbeute und langfristige Fotostabilität. Somit eignen sie sich prinzipiell zur Darstellung der chromosomalen Eigenschaften von Zellen und sollen im laufenden Projekt als Ersatz für die fluoreszenzmarkierte Visualisierung von DNA-Abschnitten in Spermien entwickelt werden. Zunächst musste geklärt werden, wie GNP in Zellen aufgenommen werden, wie sie intrazellulär verteilt werden und welche Konsequenzen dies für die Lebensfähigkeit und Funktion insbesondere von Reproduktionszellen hat. Bisher ist wenig über ihre Wirkung auf Gameten und Embryonen bekannt, in deren Genom und Epigenom komplexe Veränderungen ablaufen, die sie evtl. empfindlicher gegenüber GNP reagieren lassen als somatische Zellen.

Es wurde gezeigt, dass kolloidal gelöste GNP zur Einzelpartikeldetektion mindestens eine Partikelgröße von 60 nm haben müssen, um sie im konfokalen Mikroskop sicher zu erkennen. In Zellen eingedrungen, lassen sich über Streulichtmessungen im konfokalen Mikroskop aber auch GNP-haltige Zellen von solchen ohne GNP unterscheiden, wenn die GNP mit einem Durchmesser von 15 nm in einer Konzentration von 50 mM vorliegen. Nach 48 Std. Koinkubation drangen die GNP in Zellen einer immortalisierten bovinen Zelllinie ein. Dabei wurde keine Kolo-kalisation mit Endosomen oder Lysosomen gefunden. Allerdings wurde im TEM eine Lokalisation an elektronendichten Strukturen erkannt. GNP mit einem 15 nm Durchmesser wurden mit bovinen Spermien in verschiedenen Konzentrationen koinkubiert. Sowohl im Konfokal- als auch im Elektronenmikroskop ist deutlich eine enge Assoziation der GNP mit der Plasmamembran in der Hals- und Kopfregion der Spermien zu erkennen. Morphologie und Membranintegrität der AuNP-exponierten Spermien unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe. Allerdings kam es nach Inkubation mit 50 μ M Au zu einem signifikanten Abfall der Motilität. Dieselbe Konzentration scheint auch Einfluss auf die Eizellpenetrationsfähigkeit der Spermien *in vitro* zu haben. Weiterhin wurde die Wirkung von AuNP auf die Embryonalentwicklung getestet. Die erfolgreiche Injektion von AuNP in die Blastomere eines Mausembryos wurde durch konfokale Mikroskopie bestätigt. Die Embryonen entwickelten sich morphologisch unauffällig. Es wurden keine Verzögerungen im zeitlichen Ablauf der Embryogenese festgestellt. Mittels RT-PCR konnten keine Änderungen bei der Expression von embryonalen Schlüsselgenen festgestellt werden (Bax, Bcl2l2, Tp53, Oct4, Nanog, Dnmt3a).

TAYLOR *et al.* 2010. Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged gold nanoparticles. *Cytometry A*. 77:439-446.
KLEIN *et al.* 2010. Quantitative visualization of colloidal and intra-

cellular gold nanoparticles by confocal microscopy. *J Biomed Opt* 15:036015.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Laser Zentrum Hannover e.V.

8.3 FUNKTIONELLE GENETIK UND BIOREGULATION

Der tierische Organismus muss sich in vielfältiger Weise an unterschiedliche Umweltbedingungen anpassen. Dabei werden Reize aus der Umgebung aufgenommen, zentralnervös verarbeitet und beantwortet. Die Reaktion des Organismus spiegelt sich in Veränderungen bei einzelnen oder mehreren Funktionskreisen wieder. Die einzelnen Regulationssysteme sind sehr komplex und interagieren oft sehr stark untereinander. Bei der Reizverarbeitung und -beantwortung spielen Neuropeptide und endokrin wirksame Körpersubstanzen eine wichtige, oftmals entscheidende Rolle. Als zentralnervöser Integrationsort hormoneller Regulation fungieren verschiedene Gehirnregionen, u. a. das Zwischenhirn (Hypothalamus).

Ziel dieser Arbeiten ist ein tieferes Verständnis der züchtungsbiologischen Grundlagen hormongesteuerter Systeme der Adaptation, des Wachstums und der Reproduktion bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Studien zur pränatalen Entwicklung des Adaptationssystems

Die pränatale Entwicklung ist in der Regel nicht reversibel und daher entscheidend für die normal ablaufenden Körperfunktionen wie z. B. Reproduktion, Wachstum oder Verhalten. Ziel des Projektes, das in Zusammenarbeit mit der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Utrecht durchgeführt wurde, ist es, Korrelate zwischen vorgeburtlichen Entwicklungsvorgängen und späterer (postnataler) Funktionsfähigkeit der Systeme herauszuarbeiten. Diese können dann zur Beurteilung der Wirkung von exogenen Faktoren, wie z. B. Stress, Haltungsverfahren oder Medikamente sowie endogenen Faktoren, wie z. B. intrauterine Infektionen auf die vor- und nachgeburtliche Entwicklung herangezogen werden. In den ersten zwei Abschnitten dieses Vorhabens wurde zunächst eine Methode zur Identifizierung und Beobachtung der Feten entwickelt. Danach wurde diese Methode eingesetzt, um die Wirkung von Opioiden auf die fetale Herzfrequenz zu studieren. Der dritte Abschnitt befasst sich mit fetalen Bewegungen. Die fetale Herzfrequenz und die fetale Bewegung fungieren als Entwicklungsindikatoren.

Wiederholte ultrasonographische Observation von fetalen Bewegungen wurde benutzt, um die folgenden vier Faktoren zu studieren: isolierte Kopfbewegungen, Bewegung

der Vorderbeine, Rotation und Bewegungen des ganzen Körpers. Darüber hinaus wurde die mögliche Existenz von sogenannten „rest-activity“ Zyklen bei Schweinefeten untersucht. Mit Hilfe der von uns entwickelten Methode zur Identifikation der Feten wurden ultrasonographische Beobachtungen von jeweils einer Stunde bei 10 Feten von 10 Sauen in den letzten vier Wochen der Trächtigkeit durchgeführt. Die Ultrasonographie wurde in 3-5-tägigen Intervallen bei jedem Fetus wiederholt. Die allgemeinen Körperbewegungen nehmen gegen Ende der Trächtigkeit ab. Fetale Bewegungen zeigen „rest-activity“ Zyklen. Interessanterweise finden diese „rest-activity“ Perioden beim Schweinefetus für jede Bewegung unabhängig von den anderen Bewegungen statt. Die Ergebnisse dieser Studie liefern Referenzdaten für die zukünftigen Studien.

COHEN *et al.* 2010. Fetal movements during late gestation in the pig: A longitudinal ultrasonographic study. *Theriogenology* 74:24-30.

University of Utrecht (Niederlande); Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Die Regulation des Follikelwachstums durch Steroide ist altersabhängig

Die weibliche Reproduktionsleistung sinkt mit zunehmendem Alter. Die Ovarien und insbesondere die Follikel sind die primären Ziele dieses Effektes. Die altersabhängigen Veränderungen der Ovaraktivität sind eng korreliert mit hormonellen Veränderungen, vor allem der zirkulierenden Level an Gonadotropinen und Geschlechtssteroiden. Wir haben die Interaktionen zwischen reproduktivem Alter, Geschlechtshormonen und Wachstumsmuster der präovulatorischen Follikel untersucht. Für die Studien wurden Hennen unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Reproduktionsleistung verwendet. Die Follikel wurden 1,5 h bzw. 14,5 h nach erfolgter Ovulation (p. o.) entnommen. Während sowohl bei jüngeren (29 bis 31 Wochen alt) als auch älteren (62 bis 82 Wochen alt) Hennen mit hoher Reproduktionsleistung das Follikelwachstum kontinuierlich zunahm, zeigten ältere Hennen mit geringer Legeaktivität zwischen 1,5 h und 14,5 h p. o. kein Wachstum der Follikel. Interessanterweise war das Follikelvolumen bei hoher Reproduktionsleistung negativ korreliert ($p < 0,01$) mit den Plasma-Östrogenwerten, während bei geringer Reproduktionsleistung der älteren Hennen eine positive Korrelation ($p < 0,05$) zwischen beiden Parametern vorlag. Eine pharmakologische Hemmung der Steroidsynthese bewirkte bei jungen Hennen einen signifikanten Anstieg des Follikelvolumens. Östrogene führten zu verstärkter Proliferation der Granulosazellen bei beiden Altersgruppen mit hoher Reproduktionsleistung. Dieser Effekt war von der Interaktion zwischen Testosteron und Luteinisierendem Hormon (LH) abhängig.

Die Untersuchungen haben erstmalig detailliert die vielfältigen hormonellen Interaktionen auf das altersabhängige Wachstumsmuster der präovulatorischen Follikel beim Le-

gehuhn beschrieben. Östrogene spielen dabei abhängig vom Alter eine duale Rolle: sie stimulieren das Follikelwachstum bei alten Hennen, während sie inhibierend bei jungen Hennen wirken. Testosteron und LH sind ebenfalls an der Regulation des Follikelwachstums beteiligt, insbesondere während des präovulatorischen LH-Gipfels.

LEBEDEVA *et al.* 2010. Age-dependent role of steroids in the regulation of growth of the hen follicular wall. *Reprod Biol Endocrinol* 8:1-13.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING (Deutschland); Russian Research Institute of Animal Breeding, Podolsk; Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding, St. Petersburg (Russland)

Wirkung von Phytoöstrogenen auf Wachstum und Reproduktion beim Huhn

Phytoöstrogene bestehen aus einer großen Gruppe von durch Pflanzen erzeugten Komponenten. In zahlreichen Untersuchungen konnten ihre protektiven und therapeutischen Effekte auf eine Reihe von östrogenabhängigen Krankheiten, aber auch eine erhöhte Gesundheitsgefährdung z. B. bei Brustkrebs nachgewiesen werden. Die jeweiligen Wirkungsmechanismen sind noch nicht vollständig untersucht, scheinen aber komplex und von zahlreichen und individuellen Faktoren abhängig zu sein. Daidzein ist ein wichtiges isoflavonerges Phytoöstrogen, das sowohl antioxidative und antiproliferative als auch östrogene und anti-östrogene Wirkung besitzt. Letztere Effekte werden hauptsächlich über Interaktionen mit den Östrogenrezeptoren erreicht, während andere auch unabhängig von einer Bindung an diese Rezeptoren erfolgen. In früheren Studien haben wir bereits einige Wirkungen von Daidzein auf die Reproduktionsleistung beim Geflügel aufzeigen können. In der vorliegenden Studie haben wir *in vitro* die Östrogenaktivität von Daidzein untersucht und als Indikator die Expression von Vitellogenin II (VTG), einem Vorläufer des Eidotterproteins in primären Hepatocyten des Huhnes, verwendet. Die VTG-Synthese erfolgt östrogenabhängig. Daidzein kann ebenfalls die VTG-Synthese induzieren, jedoch auf etwa 300fach niedrigerem Niveau. Tamoxifen, ein Blocker der Östrogenrezeptoren, kann diese Wirkung vollständig aufheben, allerdings nicht die anti-östrogene Wirkung von Daidzein, die über den Östrogen- β -Rezeptor vermittelt wird. Im Luciferase-Reporter-Gen-Assay konnten wir nachweisen, dass diese Effekte über die Bindung am Östrogen-„response“-Element auf dem Promoter des Rezeptorgens erfolgt. Dabei zeigt Daidzein eine größere Wirkung als Antagonist für die β -Rezeptor-vermittelte Aktivität. Die duale Wirkung von Daidzein ist abhängig von den zirkulierenden Östrogenkonzentrationen und muss bei der Zusammenstellung der Futtermittel im Hinblick auf die Reproduktionsleistung der Legetiere Berücksichtigung finden.

Ni, *et al.* 2010. Dual effects of daidzein on chicken hepatic vitellogenin II expression and estrogen receptor-mediated transactivation *in vitro*. *Steroids* 75, 245-251

Wei, X.J., *et al.* 2010. The effect of equol injection in ovo on post-hatch growth, meat quality and antioxidation in broilers. *Animal* 101:1-8.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING (Deutschland); Nanjing Agricultural University, Nanjing; Animal Science Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou (beide China)

Intrazelluläre Regulationsmechanismen der Ovarfunktion

Die Reproduktionsleistung unserer landwirtschaftlichen Nutztiere unterliegt vielfältigen Regulationsmechanismen, die sowohl von exogenen als auch endogenen Faktoren beeinflusst werden. Einer unserer Forschungsschwerpunkte beschäftigt sich mit lokalen zellulären und subzellulären Interaktionen im weiblichen Reproduktionstrakt. So werden z.B. im Ovar eine Reihe von Proteinkinasen synthetisiert. Abhängig vom Zelltyp, dem physiologischen Status und dem hormonellen Einfluss werden verschiedene Proteinkinasen intrazellulär vorgehalten, die sowohl bei der Regulation der Zellproliferation, der Oozytenreifung und der hormonellen Synthese eine zentrale Rolle spielen. Es ist offensichtlich, dass diese zellulären und subzellulären Regulationsprozesse mit hoher Komplexität verbunden sind. Unsere Untersuchungen haben unter Einbeziehung verschiedener Tierarten verdeutlicht, dass Proteinkinasen und deren physiologische Regulation als Indikatoren zur Charakterisierung und Kontrolle der Reproduktionsleistung (Follikulogenese und -atresie, Gelbkörperfunktion etc.) verwendet werden können. In einer weiteren Studie wurden die Effekte von cAMP-abhängigen intrazellulären Mechanismen auf die ovarielle Steroidsynthese und -sekretion dargestellt. Es konnte der Einfluss auf die lokale Produktion von Progesteron und Testosteron, aber interessanterweise nicht auf die Östrogensynthese gezeigt werden. Außerdem konnten wir die Beteiligung der Peptidhormone IGF-1 (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1) und Ghrelin an der ovariellen Steroidhormonsekretion nachweisen. cAMP-abhängige intrazelluläre Mechanismen sind weiterhin an der Inhibition der Steroidsynthese beteiligt, allerdings beeinflussen sie nicht die hormonellen Wirkungen von FSH (Follikel-stimulierendes Hormon), IGF-1 und Ghrelin auf die Steroidproduktion.

CHRENEK *et al.* 2010. The cAMP analogue dbcAMP affects release of steroid hormones by cultured rabbit ovarian cells and their response to FSH, IGF-1 and ghrelin. *Europ J Pharmacol* 640:202-205.

SIROTKIN *et al.* 2010. Protein Kinases and ovarian functions. *J Cell Physiol* 226:37-45.

Animal Production Research Centre Nitra; Slovak University of Agriculture; Constantine the Philosopher University (alle Nitra, Slowakei); Friedrich-Loeffler-Institut, ING

9 WEITERE ARBEITSGEBIETE

9.1 PATHOPHYSIOLOGIE

Charakterisierung von durch PRRS-Virus induzierten pulmonalen Dysfunktionen und Lungenläsionen beim Schwein. Erstmals wurden Dysfunktionen der Atmung infolge einer experimentell induzierten Infektion mit PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Isolat VR-2332) charakterisiert und in Beziehung zu klinischen und pathologischen Befunden evaluiert. Methodisch basierten die unter Spontanatmung durchgeführten nicht-invasiven Lungenfunktionstests auf dem Impuls-Oszilloresistometrie-System sowie einem Rückatmungsverfahren unter der Verwendung der Testgase Helium (He) und Kohlenmonoxid (CO).

Als prägnanteste klinische Symptome entwickelten die mit PRRSV infizierten Schweine etwa 9 Tage *post inoculationem* (dpi) Fieber, Appetitlosigkeit, ein forciertes Atmungsmuster und Abgeschlagenheit. Periphere Atemwegobstruktionen, eine verminderte Lungendehnbarkeit und Beeinträchtigungen im pulmonalen Gasaustausch (messbar als verminderter CO-Transferfaktor) waren die auffälligsten durch PRRSV induzierten Lungenfunktionsstörungen. Letztere waren im Zeitraum 9–18 dpi am deutlichsten ausgeprägt und spiegelten sich klinisch in Form einer signifikant erhöhten Atemfrequenz bei zugleich vermindertem Atemzugvolumen (Kurzatmigkeit) wider. Die daraus resultierende Dyspnoe war während der Expiration deutlicher ausgeprägt als während der Inspiration. Histopathologische Untersuchungen des Lungengewebes zeigten multifokale interstitielle Pneumonieherde, welche 10 dpi deutlicher ausgeprägt waren als 21 dpi. Diese interstitiellen Veränderungen des Lungengewebes stellten das strukturelle Korrelat zu den funktionellen Beeinträchtigungen von Lungendehnbarkeit und pulmonalem Gasaustausch dar.

WAGNER *et al.* 2010. Respiratory function and pulmonary lesions in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet J* [Epub ahead of print; doi: 10.1016/j.tvjl.2009.12.022]

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP; Bioscreen EVDMC GmbH, Münster; Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH; Ingelheim (alle Deutschland); University of Minnesota, Department of Veterinary and Biomedical Sciences, St. Paul (USA)

Atemkondensat als zukunftssträchtiges diagnostisches Medium? – Komparativer Forschungsansatz für Mensch und Tier auf der Basis speziesübergreifender Erkenntnisse

Der Begriff Atemkondensat (engl. exhaled breath condensate; EBC) beschreibt jegliches biologisches Substrat,

welches durch Kühlung der Ausatemluft zu gewinnen ist. Da die Methode der Kondensatgewinnung technisch unkompliziert, nicht-invasiv, wiederholbar und unabhängig von der Mitarbeit des Patienten oder Probanden ist, stellt EBC ein höchst innovatives und interessantes diagnostisches Material dar. Aus der veterinärmedizinischen Forschung resultieren fundierte Erkenntnisse zur Gewinnung und diagnostischen Nutzung von EBC aus Studien, die unter anderem an Kälbern, Schweinen, Pferden, Katzen und Hunden durchgeführt wurden. Diese Studien in domestizierten Tierarten haben substanziiell zum gegenwärtigen Wissensstand über das Potenzial EBC-basierter diagnostischer Ansätze (Nachweis von Proteinen, Leukotrienen, Hydrogenperoxid, Harnstoff, Ammonium, Azidität bzw. pH-Wert von EBC) beigetragen. Zugleich identifizierten sie Schwachstellen und Fehlerquellen in der bisherigen EBC-Diagnostik. Spezies-unabhängig besteht weiterer Forschungsbedarf bezüglich einer standardisierten Gewinnung und Aufarbeitung von EBC sowie im Hinblick auf die Validierung von im EBC analysierbaren Biomarkern. Interdisziplinäre Ansätze im Sinne der komparativen Medizin sind nutzbringend für die Human- wie auch für die Veterinärmedizin und eröffnen weiterführende Forschungsperspektiven zur Nutzung der Ausatemluft als diagnostisches Medium.

REINHOLD P. UND H. KNOBLOCH. 2010. Exhaled Breath Condensate: Lessons learned from Veterinary Medicine. *J Breath Res* 4:017001 (15pp) Online at stacks.iop.org/JBR/4/017001

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP

9.2 ARBEITSGRUPPE INTERNATIONALE TIERGESUNDHEIT

Im Rahmen von Projekten internationaler Organisationen arbeitet die Arbeitsgruppe überwiegend in Ländern Osteuropas, Asiens und Afrikas. Die Aufgaben reichen von der Beratung zur Prävention und Überwachung von Tierkrankheiten bis hin zur Krisenkommunikation, sowie zu Strategien der Entschädigung von Tierverlusten und Ausbildungen in Diagnostik und Epidemiologie verschiedener Tierseuchenerreger.

Afrikanische Schweinepest (ASP)

Die ASP, die 2007 über Georgien in den Kaukasus eingeschleppt wurde, hat sich mittlerweile bis an die ukrainische Grenze ausgebreitet. Die ukrainischen Veterinärbehörden wurden bezüglich Erkennung, Vorbeugung und Seuchenbekämpfung beraten und die Gefahrenlage für die Ukraine

abgeschätzt (EU-Mission in der Ukraine, August 2010).

Die International Atomic Energy Agency (IAEA) hatte zudem die Erstellung eines umfassenden Kontroll- und Bekämpfungskataloges für den Veterinärdienst und das Nationale Labor im westafrikanischen Benin im Kampf gegen die Afrikanische Schweinepest beauftragt. Es wurden dazu detaillierte Empfehlungen für die IAEA, die Direction d'Élevage in Benin, das Veterinärlabor, die Nationalparkbehörde und die Tierproduzenten erarbeitet (IAEA, Benin, August-September 2010).

Kontrolle und Eradikation der Klassischen Schweinepest (KSP) in Ungarn und der Slowakei

Sowohl in Ungarn als auch in der Slowakei wurden im letzten Jahr keine KSP-Fälle bei Wildschweinen diagnostiziert. In Zusammenarbeit mit den nationalen Behörden galt es, ein Überwachungsprogramm für Wildschweine für die Zeit nach einer Epidemie auszuarbeiten (EU-Task Force, Ungarn und Slowakei, Dezember 2010).

Porcines Respiratory and Reproductive Syndrome (PRRS) – Einschätzung der Gefahr für Neuseeland

Neuseeland führt zurzeit kein Schweinefleisch aus Ländern ein, in denen PRRS endemisch vorkommt. Eine sehr kontrovers diskutierte Risikoeinschätzung zu Frischfleisch und PRRS wurde geführt (EU-Gutachten, November 2010).

Aviäre Influenza

Die rasante Verbreitung der hochpathogenen aviären Influenza vom Subtyp H5N1 über Eurasien nach Europa, Nord- und Westafrika und das auch permanente Auftreten von H5N1 in bestimmten Regionen macht einen permanenten Ausbau der Laborkapazitäten erforderlich. In verschiedenen Projekten mit der FAO wurde der Auf- bzw. Ausbau nationaler und regionaler Labore vor Ort unterstützt. In einem OIE finanzierten Projekt geht es um die Evaluierung der LAMP-Technologie hinsichtlich ihres möglichen Einsatzes in Laboren in Entwicklungsländern (FAO, Nepal, Februar-April; OIE/FAO, Beginn 1. Dezember 2010).

Bovine Tuberkulose im südlichen und östlichen Afrika

Zwei durch die EU und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderte Langzeit-Projekte untersuchen das Vorkommen von *Mycobacterium bovis* in den Wild- und Haustieren in Nationalparks im südlichen und östlichen Afrika (Tansania, Kenia, Mosambik).

Die Projekte werden in enger Kooperation mit lokalen Partnern durchgeführt, was sowohl den Ausbau der Laborkapazitäten vor Ort als auch die Ausbildung des wissenschaftlichen Personals beinhaltet. Die tansanischen und mosambikanischen Doktoranden wurden in GIS und Epidata eingeführt. Am Rande der Selous Game Reserve (Tansania)

wurden Tuberkulinisierungen und Blutentnahmen bei Rindern durchgeführt. Beprobungen von Nutz- und Wildtieren fanden zudem im und am Rande des Masai Mara National Parks (Kenia) statt. In Maputo (Mosambik) wurde eine Schlachthofstudie zum Vergleich verschiedener Diagnostika begonnen. (EU FP7, DFG, südliches und östliches Afrika, ganzjährig 2010)

Entwicklung und Anwendung eines Instruments zum Vergleich von Laborfunktionalitäten in „Hot-spot“ Gebieten (Asien, Afrika, Südamerika)

Das FLI ist an der Konzeption des IDENTIFY-Projektes der FAO beteiligt. Die aktuelle Methodik in der Diagnostik relevanter viraler, bakterieller und parasitärer Tierkrankheiten in Afrika und Asien wurde erfasst und eine Liste von relevanten Krankheiten für die asiatischen Länder erstellt. Eine Begutachtung von Laboren und Trainingsmaßnahmen zu emerging infectious diseases wurden in Manila (Philippinen), Phnom Penh (Kambodscha), Bangkok, (Thailand), Vientiane (Laos) und Katmandu (Nepal) durchgeführt. Die erste Auswertung fand in der FAO-Zentrale in Rom statt und es wurde ein Instrument zur vergleichenden Bewertung der Laborfunktionalitäten erstellt. Dieses soll auch zukünftig in Afrika und Südamerika angewandt werden. (FAO, Südostasien, April – Dezember 2010)

9.3 INFORMATIK, BIOSTATISTIK, DOKUMENTATION

Einfluss des Handels auf die Ausbreitungsdynamik von Tierseuchenerregern

Im Jahr 2010 wurden verschiedene Algorithmen angewendet, um Cluster im Handelsnetz zwischen Betrieben der Produktionskette Schwein zu identifizieren. In Clustern werden Betriebe zusammengefasst, die untereinander häufig, zu Betrieben anderer Cluster selten handeln. Es ist in diesem Zusammenhang wichtig anzumerken, dass die räumliche Lage der Betriebe bei der Clusterbildung nicht verwendet wird.

Die Untersuchung umfasste 121.287 Betriebe der Produktionskette Schwein, für die im Zeitraum vom 1.6.2006 bis zum 31.12.2008 zumindest eine Tierbewegung an HI-Tier gemeldet wurde. Im Beobachtungszeitraum wurden ca. 330.000 Handelskontakte gezählt.

97 % der Betriebe konnten zu neun großen Clustern zugeordnet werden, die interessanter Weise geografisch zusammenhängende Regionen bilden. Die Cluster sind hinsichtlich der Ausbreitung von Infektionskrankheiten bedeutsam. Zwischen den Clustern sind Grenzen, die aufgrund der im Vergleich zu den Handelsaktivitäten innerhalb der Cluster

verminderten Handelsaktivität die Ausbreitung von Infektionserregern behindern.

Da die Grenzen der identifizierten Handelscluster nicht immer mit Landesgrenzen zusammenfallen, müssen Überlegungen zum länderübergreifenden Tierseuchenmanagement neu diskutiert werden.

LENTZ ET AL. 2011. Trade communities and their spatial patterns in the German pork production network. *Prev Vet Med* 98:176-181

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, München; HIT-CID Datenbank, München; Universität Bonn (alle Deutschland)

9.4 SAMMLUNG VON ZELLINIEN IN DER VETERINÄRMEDIZIN

Die Aufgaben der Zellbank umfassen die Etablierung, Charakterisierung und Sammlung von Zelllinien für die veterinärmedizinische Forschung und Diagnostik. Aktuell befinden sich über 1.200 Linien im Bestand, darunter Zelllinien von Pferd, Rind, Schwein, Schaf und Ziege und Nutzgeflügel sowie weiterer Säugetiere, aber auch von Insekten, Fischen, Reptilien und Singvögeln (70 verschiedene Tierarten). Die Zelllinien werden regelmäßig auf Kontaminationen (Mycoplasmen, Bakterien, BVDV) und ihre Identität geprüft. In 2010 wurden 61 neue Zelllinien in die Zellbank aufgenommen. Dabei handelt es sich um 11 etablierte Linien aus anderen wissenschaftlichen Einrichtungen des In- und Auslandes sowie um 16 gentechnisch veränderte Linien verschiedener Arbeitsgruppen des FLI. Weiterhin wurden 34 Eigenanzüchtungen (Moschusspitzmaus, Afro-australischer Seebär, Maus [Interferon- α,β -Rezeptor-negativ], Lama, Alpaka, Großer Panda), deren Linienentwicklung noch nicht abgeschlossen ist, aufgenommen.

2010 wurden ca. 1.200 Zellkulturen abgeben, davon 346 an 88 verschiedene Einrichtungen des In- und Auslandes.

MALDI-Typisierung von Zellkulturen

Kontaminationen, Verwechslungen und Fehlbezeichnungen stellen ein erhebliches Problem beim Umgang mit Zellkulturen dar. Dies trifft im besonderen Maße für veterinärvirologische Einrichtungen zu, da in diesen häufig Zell- oder Gewebekulturen verschiedener Tierspezies gleichzeitig vorrätig gehalten oder gehandhabt werden müssen. Als möglicher Lösungsansatz für dieses Problem wurde in dieser Studie die schnelle, aber dennoch sehr aussagekräftige Typisierung von Bakterien durch MALDI-TOF auf tierische Zellkulturen angepasst. MALDI-TOF ist eine Massenspektrometrie, die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit einer Flugzeitanalyse kombiniert. Eine Spektrensammlung von 66 Zellkulturen aus 34 Spezies von Insekten bis Primaten wur-

de erstellt, die eine eindeutige Speziesidentifizierung eines großen Teiles der in dieser Sammlung enthaltenen Zellkulturen erlaubt. Spektrengestützte phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass die Spektren wesentlich durch die Taxonomie beeinflusst werden. Die Methode eignet sich daher auch zur Speziesbestimmung unbekannter Zell- und Gewebekulturproben.

KARGER *et al.* (2010). Rapid characterisation of cell cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric typing. *J Virol Methods* 164:116-21.

9.5 VIRUSBANK

Die Aufgabe der Virusbank ist die Sammlung, Konservierung und Dokumentation von authentischen, für die Veterinärmedizin bedeutsamen Virusstämmen. Zum Sammlungsumfang zählen neben international anerkannten Referenzstämmen solche Virusstämme und -isolate der wichtigsten Haustiere, die als "nationale" Referenzstämme dienen bzw. Krankheitsgeschehen zeitlich und räumlich dokumentieren. Nicht erfasst werden in der Regel solche Viren, die in nationalen Referenzlaboratorien bearbeitet werden. In die Sammlung werden vorrangig Virusstämme aufgenommen mit guter Datenlage, deren Herkunft, Identität und Kontaminantenfreiheit (einschließlich Mykoplasmen und Fremd-viren) bekannt bzw. geprüft ist.

Im Bestand der Virusbank befinden sich gegenwärtig mehr als 900 Virusstämme und -isolate in etwa 75 Spezies von Rind, Schwein, Pferd, Hund, Katze, Kaninchen und Geflügel, aber auch von Ziege, Schaf, Ren, Giraffe, Afrikanischem Elefant und verschiedenen Fischarten.

2010 wurden etwa 15 verschiedene Virusstämme abgegeben, diese zum Teil mehrmals an verschiedene Adressaten. Empfänger waren 17 verschiedene Einrichtungen des In- und Auslandes, darunter Untersuchungsämter, Forschungsinstitute bzw. Universitäten und private Firmen.

NATIONALE UND INTERNATIONALE FORSCHUNGSVERBÜNDE UND EXZELLENZNETZWERKE:

A) EUROPÄISCHE UND INTERNATIONALE FORSCHUNGSVERBÜNDE

Forschungsverbund / Netzwerk	Beteiligte Institute am FLI
EPIZONE FP6 Network of Excellence, 19 Partner, 2006-2011 Epizootic Disease Diagnosis and Control	IVD, IMED, IMB, IfE, IfI, INNT
NADIR FP7 Forschungsinfrastruktur-Ausschreibung, 14 Partner, 2009-2013 The Network of Animal Disease Infectiology Research Facilities	INNT
Xenome FP6 Integrated Project, 21 Partner, 2006-2011 Engineering of the porcine genome for xenotransplantation studies in primates: a step towards clinical application	ING
EMPERIE FP7 Large-scale integrating project, 12 Partner, 2009-2014 European Management Platform for Emerging and Reemerging Infectious Disease Entities	IVD
IMAQUNIM FP6 Integrated Project, 20 Partner, 2005-2010 Improved immunity of aquacultured animals	IMED
WILDTECH FP7 Large Collaborative Project, 14 Partner, 2009-2013 Novel Technologies for Surveillance of Emerging and Re-emerging Infections of Wildlife	IMP
Rednex FP7 Large-scale integrating project, 11 Partner, 2008-2013 Innovative and practical management approaches to reduce nitrogen excretion by ruminants	ITE
ASFRISK FP7 Small or medium-scale focused research project, 17 Partner, 2008-2011 Evaluating and controlling the risk of African Swine fever in the EU	IMB
CSFV-GODIVA FP7 Small or medium-scale focused research project, 17 Partner, 2009-2013 Improve tools and strategies for the prevention and control of classical swine fever	IVD
ICONZ FP7 Collaborative project im SICA Programm der EU, 2009 -2014 Integrated control of neglected zoonoses: improving human health and animal production through scientific innovation and public engagement	IMP, AG-ITG
EQADeBa Förderprogramm der Exekutivagentur für Gesundheit und Verbraucher, 23 Partner, 2008-2011 Establishment of Quality Assurance for Detection of Highly Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism	IBIZ
Network DAFINET Danish Council for Strategic Research, 15 Partner, 2009-2013 Danish Fish Immunology Research Network	IMED
FLUPIG FP7 Large-scale integrating project, 10 Partner, 2010-2014 Pathogenesis and transmission of influenza in pigs	IMB, ATB
PRIORITY FP7 Large-scale integrating project, 20 Partner, 2008-2013 Protecting the food chain from prions: shaping European priorities through basic and applied research	IfI
FMD-DISCONVAC FP7 Small or medium-scale focused research project, 14 Partner, 2009-2013 Development, enhancement and complementation of animal-sparing, foot-and-mouth disease vaccine-based control strategies for free and endemic regions	IVD
ERINHA FP7 Infrastructure project, 20 Partner, 2010-2013 European Research Infrastructure on Highly Pathogenic Agents	INNT

NEW-FLUBIRD

FP6 STREP, 13 Partner Partner, 2007-2010
 Network for Early Warning of Influenza Viruses in Migratory Birds in Europe

IVD, IfE

B) NATIONALE FORSCHUNGSVERBÜNDE

Forschungsverbund / Netzwerk	Beteiligte Institute
DFG Exzellenzcluster Exzellenzcluster REBIRTH der Medizinischen Hochschule Hannover seit 2006 From Regenerative Biology to Reconstructive Therapy	ING
Nationale Forschungsplattform für Zoonosen BMBF gefördertes, interdisziplinäres Informations- und Servicenetz für die Zoonose-Forschung, 2009 – 2011	INNT
BMBF-Forschungsverbünde Zoonosen Arbovirusinfektionen in Deutschland (2007-2010) Die Zoonose Botulismus (2007-2010) Q-Fieber - Erforschung der molekularen Pathogenese des Q-Fiebers und ihre Anwendung und Diagnostik und Epidemiologie in Deutschland (2007-2013) Zoonotische Chlamydien - Modelle für chronische und persistente Infektionen bei Mensch und Tier (2007-2013) ZooMap- <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> - von der Johne'schen Krankheit zum Morbus Crohn (2007-2013) Toxoplasmose - Netzwerk zur Toxoplasmose bei Mensch und Tier in Deutschland: Pathogenese, Risikofaktoren und Kontrolle (2007-2013) Influenza – FluResearchNet (2007-2013) Lyssavirus Research Network - (2010-2013): RESET - Resistenzen bei Tier und Mensch - gemeinsame Forschung in Deutschland MedVet-Staph - Interdisziplinäres Forschungsnetzwerk zur zoonotischen Bedeutung von Staphylococcus aureus / MRSA	INNT IBIZ IBIZ IMP, IfI IMP IfE IfI IMB, IfE, IVD, IMED ING IfE, ING
BMBF Kompetenznetze Agrarforschung PHÄNOMICS Ein systembiologischer Ansatz zur Genotyp-Phänotyp-Abbildung bei den Nutztieren Rind und Schwein (2010 – 2013) SYNBREED: Innovationscluster Synergistische Pflanzen- und Tierzucht (2010 – 2013)	IMB, INNT, IVD ING
BMBF Forschungsverbünde Forschung für die zivile Sicherheit: ATLAS: Autonomes-Tierseuchen-Lab-on-a-Chip-System (2007 - 2010) PathoSafe: Raman-Spektroskopie zur Detektion agroterroristisch relevanter Erreger der Sicherheitsstufe 3 (2008 -2012) SiLeBAT: Sicherstellung der Futter- und Lebensmittelwarenkette bei bio- und agro-terroristischen (BAT-)Schadenslagen (2010-2013)	IBIZ, IfE IBIZ IfE
BMBF Forschungsverbünde Forschung für die zivile Sicherheit: ATLAS: Autonomes-Tierseuchen-Lab-on-a-Chip-System (2007-2010) PathoSafe: Raman-Spektroskopie zur Detektion agroterroristisch relevanter Erreger der Sicherheitsstufe 3 (2008 -2012)	IBIZ IBIZ
BMBF Forschungsverbünde: Gewinnung pluri- bzw. multipotenter Stammzellen Induzierte pluripotente Stammzellen in Großtiermodellen (IPSiLAM) (2008-2011)	ING
BMBF Forschungsverbünde: Zellbasierte, regenerative Medizin; Regenerative therapies for heart failure (2009-2012)	ING
BMBF Forschungsverbund PET/CT zur Darstellung von Infektion und Entzündung: Reduction, Refinement und Replacement von Tierversuchen	IMP
DFG-Forschergruppen: RU 1041 Germ Cell Potential RU 535 Xenotransplantation	ING ING
DFG Schwerpunktprogramme: SPP 1175 Dynamics of Cellular Membranes and their Exploitation by Viruses	IMB
Netzwerk "Nagetier-übertragene Pathogene"	INNT, IfE

V. BEHÖRDLICHE AUFGABEN

1 AUFGABEN IM RAHMEN DES GENTECHNIKRECHTS

Das Friedrich-Loeffler-Institut ist Einvernehmensbehörde bei Verfahren zur Freisetzung bzw. zum Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Tieren sowie von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, die an Tieren angewendet werden sollen. Im Zusammenhang mit dieser Aufgabe ist das FLI auch beratend tätig bei der Fortschreibung des Gentechnikrechtes sowie allgemeinen Fragen der biologischen Sicherheit, soweit Tierseuchenerreger betroffen sind.

2 NATIONALE REFERENZ-LABORATORIEN

Als zuständige Bundeseinrichtung betreibt das Friedrich-Loeffler-Institut über 50 nationale Referenzlaboratorien (NRL) für anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten. Hiervon sind acht von der Weltorganisation für Tiergesundheit, dem Office International des Épizooties (OIE), als OIE-Referenzlabore bestellt. Die NRL nehmen die mit der Benennung verbundenen Aufgaben wahr und unterstützen die entsprechenden Untersuchungseinrichtungen in den Bundesländern. Die rechtlichen Grundlagen der NRL sind im Kapitel V.3 aufgeführt.

Hauptaufgabe der NRL ist die Bestätigung von Diagnosen und Abklärung von Verdachtsfällen. Hierzu zählen auch die Entwicklung und Validierung neuer sowie die kontinuierliche Optimierung der bestehenden diagnostischen Verfahren und der dazu benötigten Reagenzien. Standardisierte Verfahren werden an die entsprechenden Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer transferiert, die zudem spezifische Referenzmaterialien wie Seren und Virusstämme erhalten. Im Rahmen der Qualitätssicherung der Tierseuchendiagnostik führen die NRL Ringversuche für deutsche Untersuchungseinrichtungen durch und nehmen selbst an internationalen Ringversuchen teil.

Zu den hoheitlichen Aufgaben gehören außerdem Zulassungs- und Chargenprüfungen von veterinärmedizinischen Diagnostika, die Beratung der Veterinärbehörden sowie die Erarbeitung von Grundlagen für Leitungsentscheidungen, Stellungnahmen zu Entwürfen sowie Änderungen oder Neufassungen von Richtlinien. Weiterhin führen die NRL Import/Export-Diagnostik durch.

Die Nationalen Referenzlaboratorien am FLI wurden von der Akkreditierungsstelle (AKS) Hannover nach ISO/IEC 17025:2005 akkreditiert.

Nachfolgend geben die NRL einen Überblick ihrer Arbeiten für das Jahr 2010.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR AFRIKANISCHE SCHWEINEPEST

Blome, S.

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) wird durch ein komplexes DNA-Virus des Genus *Asfivirus* verursacht und lässt sich klinisch nicht von der klassischen Schweinepest unterscheiden. Das Virus infiziert alle Vertreter der Familie *Suidae*, zu der unter anderem das Hausschwein, das europäische Wildschwein sowie Warzen- und Buschschweine gehören. Zusätzlich kann sich das Virus in Zecken des Genus *Ornithodoros* vermehren. Das Hauptverbreitungsgebiet der ASP liegt in den afrikanischen Staaten südlich der Sahara, es sind jedoch in letzter Zeit ASP-Ausbrüche z. B. in Georgien, Armenien und Russland aufgetreten. Insbesondere die seit Ende 2007 scheinbar nicht zu beherrschende Situation in Russland gibt Anlass zur Sorge. Die ASP gehört zu den Erkrankungen, die sowohl national als auch international anzeigepflichtig sind. Die Aufgaben des Referenzlabors für Afrikanische Schweinepest (ASP) sind im Anhang IV der EU Richtlinie 2002/60 festgelegt und ergeben sich darüber hinaus aus dem Tierseuchengesetz.

Im Jahr 2010 sind in Deutschland keine Fälle von ASP registriert worden.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis (Hausschweinproben)	23

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR ANSTECKENDE SCHWEINE-LÄHMUNG (TESCHENER KRANKHEIT)

Dauber, M.

Bei der ansteckenden Schweinelähmung handelt es sich um eine Erkrankung der Haus- und Wildschweine, die durch bestimmte Virusstämme aus der Familie *Picornaviridae*, Genus *Teschovirus*, verursacht werden kann. Ihre Abgrenzung von mildereren, nicht anzeigepflichtigen Verlaufsformen ist im Einzelfall problematisch. Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles sind: a) epidemiologisch auffällige, gehäuft auftretende schwere klinische Erkrankungen, b) die histologische Untersuchung bestätigt das Vorliegen einer nicht eitrigen Polioenzephalomyelitis, c) differentialdiagnostisch sind andere Krankheiten, insbesondere Tollwut und Schweinepest, ausgeschlossen

und d) *Teschovirus* (in der Regel vom Serotyp 1) wurde identifiziert. Auf Grund der notwendigen komplexen Betrachtungsweise kann das Referenzlabor für Ansteckende Schweinelähmung lediglich Virusnachweise verifizieren, nicht jedoch eine abschließende Diagnose der Krankheit stellen.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	
RT-PCR	24
Anzüchtung, IFT	16
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	8
Abgabe von Referenzmaterialien (MAKs, Sera)	6

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR AUJESZKYSCHES KRANKHEIT

Müller, T.

Die Aujeszky'sche Krankheit (AK) kommt weltweit vor und wird durch das Suid Herpesvirus 1, auch als Pseudorabiesvirus (PrV) oder Virus der Aujeszky'schen Krankheit (AKV) bezeichnet, verursacht. Die AK ist eine gefährliche virale Schweineerkrankung und verursacht erhebliche ökonomische Schäden und Verluste in der Schweineproduktion. Infolge der Implementierung eines strikten nationalen Bekämpfungsprogrammes konnte die AK in der Hausschweinepopulation Deutschlands getilgt werden. Seit 2003 gilt Deutschland offiziell als frei von AK. Die Aufrechterhaltung des AK-freien Status ist an jährliche serologische Untersuchungen gemäß einem zweistufigen Stichprobenplan gekoppelt. Die Aufgaben des NRL für Aujeszky'sche Krankheit (AK) umfassen drei wesentliche Schwerpunkte: die Labordiagnostik (Abklärung von AK-Verdachtsfällen), die Standardisierung der Diagnostik sowie hoheitliche Aufgaben (Erarbeitung von Grundlagen für Leitungsentscheidungen, Stellungnahmen zu Entwürfen, Änderungen oder Neufassungen von nationalen, EU- bzw. OIE-Richtlinien).

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	28
Untersuchungen zum Antikörpernachweis ELISA, SNT (OIE-Empfehlung)	10
Abgabe von Referenzmaterialien	2

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR AVIÄRE INFLUENZA

Harder, T.

Die hochpathogene aviäre Influenza (HPAI) ist eine mit sehr hohen wirtschaftlichen Verlusten einhergehende, ansteckende Infektionskrankheit des Geflügels. Während in Deutschland 2010 weder bei Wildvögeln noch bei Hausgeflügel HPAI-Fälle auftraten, bleiben endemische Infektionsherde mit dem zooanthroponotischen HPAIV des Subtyps H5N1 in Südostasien und Ägypten weiterhin bestehen. Die unvermindert fortbestehende Gefahr eines neuerlichen Eintrags dieses Virus wurde im Frühjahr 2010 deutlich, als H5N1-Virus der Klade 2.3.2 im rumänischen Donaudelta (Hausgeflügel) sowie an der bulgarischen Schwarzmeerküste (Wildvogel) nachgewiesen wurde. Niedrig pathogene aviäre Influenzaviren der Subtypen H5 sowie H7 konnten auch 2010 in Wildvogelpopulationen in Deutschland nachgewiesen werden. Insbesondere Viren des Subtyps H5 waren verbreitet im Herbst in Entenvögeln anzutreffen. Parallel hierzu wurden Infektionen mit einem niedrig pathogenen H5N2 Virus in einer gemischten Geflügelhaltung in Deutschland registriert und durch Keulung des Bestandes getilgt. Weiterhin wurde H5-Virus in gehaltenen Vögeln eines Zoos detektiert. Die Untersuchungen im Rahmen des EU-kofinanzierten Monitorings von Wildvögeln entwickelten sich rückläufig, ließen aber dennoch, wie bereits in den Vorjahren, die Präsenz eines breiten Spektrums verschiedener Influenzavirussubtypen in der Wildvogelpopulation erkennen. Dagegen wurden 2010 vermehrt Untersuchungen von eingesandten porzinen Proben durchgeführt. Dies trägt einerseits den Bemühungen Rechnung, mehr über die Verbreitung des humanen pandemischen H1N1-Virus in der Schweinepopulation zu erfahren (seit 2009 drei Fälle in Deutschland), andererseits wurden Hinweise aus der Praxis verfolgt, wonach antigenetisch veränderte Influenzaviren das Infektionsgeschehen beim Schwein bestimmten. Eingedenk der Tatsache, dass 2009 auch ein Fall der Übertragung eines porzinen H1N1-Virus auf eine Putenhaltung nachgewiesen wurde, wird den epidemiologischen Geflechten zwischen Schweine- und Hausgeflügelhaltungen zukünftig mehr Aufmerksamkeit zu widmen sein.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	
Virologisch,	1742
davon porzine Proben	212
Untersuchungen zum Antikörpernachweis (ELISA)	250
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern / Isolate	99 / 19
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	0/8
Abgabe von Referenzmaterialien (nat./int.)	39/35

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BESCHÄLSEUCHE

Moser, I.

Die Beschälseuche ist eine durch den einzelligen Parasiten *Trypanosoma (T.) equiperdum* hervorgerufene, meist chronisch verlaufende klassische Deckinfektion bei Equiden. Sie zählt zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen und ist seit vielen Jahren in Deutschland getilgt. Zur Aufrechterhaltung des Status der Seuchenfreiheit werden sowohl Tiere, die importiert werden, als auch Tiere, die im Inland gezogen sind und Verwendung in der Zucht finden sollen, mittels Komplement-Bindungsreaktion (KBR; vom OIE empfohlene Methode) auf spezifische Serum-Antikörper untersucht, da ein direkter Erregernachweis außer im akuten Stadium der Erkrankung kaum möglich ist. Die enge Verwandtschaft des Erregers mit *T. evansi*, dem Erreger der Surra bei Kameliden und Equiden, kann jedoch zu Kreuzreaktivitäten bei serologischen Reaktionen führen. *T. evansi* kann beim Pferd ähnliche Symptome wie *T. equiperdum* auslösen, zählt jedoch nicht zu den Erregern einer anzeigepflichtigen Tierseuche. *T. evansi* kommt in tropischen Regionen (Nordafrika, Mittlerer Osten, Asien, Lateinamerika) vor und wird von Tabaniden übertragen. Neuere molekulare Untersuchungen deuten darauf hin, dass *T. equiperdum* keine eigene Spezies ist, sondern zum Taxon *T. evansi* gehört. Aufgrund der engen Verwandtschaft der Erreger und der Ähnlichkeit der hervorgerufenen Symptome wäre es sinnvoll, die Unterteilung der Erreger in einen „anzeigepflichtigen“ (*T. equiperdum*) und einen „nicht anzeigepflichtigen“ (*T. evansi*) zu beenden und zu definieren, dass Beschälseuche durch Trypanosomen der Spezies *T. equiperdum* / *T. evansi* verursacht und damit der Nachweis beider Erreger reglementiert wird.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	17
Untersuchungen zum Antikörpernachweis Komplement-Bindungsreaktion (OIE-Empfehlung)	2
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	2
Abgabe von Referenzmaterialien	84

NATIONALE REFERENZLABORE FÜR BLAUZUNGENKRANKHEIT, EPIZOOTISCHE HÄMORRHAGIE DER HIRSCHEN UND AFRIKANISCHE PFERDEPEST

Hoffmann, B.

Das Bluetongue Virus (BTV), das Virus der Epizootischen Hämorrhagie (EHDV) und das Virus der Afrikanischen Pferdepest (AHSV) gehören zu den Orbiviren aus der Familie Reoviridae. Die doppelsträngige RNA liegt in 10 Segmenten vor. Momentan werden 24 Serotypen bei BTV, 8 Serotypen bei EHDV und 9 Serotypen bei AHSV unterschieden. Sowohl die doppelsträngige RNA als auch die vielen unterschiedlichen Serotypen sind für die Diagnostik von Orbiviren von besonderer Bedeutung. Im August 2006 wurde in Deutschland erstmalig BTV festgestellt. Hierbei handelte es sich um den BTV-Serotyp 8. Im November 2008 wurde an der Grenze zu den Niederlanden BTV vom Serotyp 6 festgestellt. 2008 breitete sich der Serotyp 1 in Südwestfrankreich in Richtung Norden weiter aus und stellt eine ständige Bedrohung für Deutschland dar. Im Jahre 2009 wurden nur wenige neue BTV-Fälle in Deutschland festgestellt (insgesamt 142) und im Jahr 2010 konnte kein BTV-Ausbruch nachgewiesen werden. Für die Diagnostik von BTV stehen zugelassene ELISA-Kits und Real-time-RT-PCR-Systeme zur Verfügung. Die eingehende Prüfung im Rahmen der Zulassung und die Chargentestung dieser kommerziellen Diagnostika stellen einen wichtigen Aufgabenbereich des NRL BT dar. Spezifische serologische und PCR-Tests zum Nachweis von BTV im Allgemeinen und für die Serotypen 8, 1 und 6 im Besonderen wurden entwickelt, validiert und teilweise den regionalen Laboren zur Verfügung gestellt. Das NRL BT nahm 2010 wiederholt sehr erfolgreich an den vom CRL durchgeführten BTV- und AHSV-Ringtesten teil.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	
BTV (real-time RT-PCR)	123
AHSV (real-time RT-PCR)	24
EHDV (real-time RT-PCR)	0
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	
BTV (ELISA)	750
BTV (NT)	23
AHSV (ELISA)	32
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	2 / 15
Abgabe von Referenzmaterialien	44

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BOVINE HERPESVIREN VOM TYP 1 (BHV-1)

Beer. M., König, P.

Im Berichtszeitraum 2010 sind dem OIE und Nationalen Referenzlabor 1.621 Serum-, Plasma- und Milchproben sowie 77 sonstige Proben (Organ- oder Zellkulturmaterial, Nukleinsäureextrakte) zur BHV-1-Abklärung zugeführt worden. Insgesamt wurden 327 Einsendungen im Zuge hoheitlicher Amtshilfe oder zu Forschungszwecken an das NRL weitergeleitet. Die Schwerpunkte lagen dabei auf dem Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern sowie der serologischen Untersuchung ungeimpfter Tiere mit Hilfe von BHV-1-Antikörper-ELISAs und dem Neutralisations- oder Plaquereduktionstest.

BHV-1-Situation in Deutschland (Zahlen vom März 2010): Im Jahr 2008 wurden 3,81 Millionen Blutproben und 286.469 Sammelmilchproben serologisch auf BHV-1 untersucht. Im Bundesdurchschnitt waren 87,7 Prozent der Bestände BHV-frei, dies ist eine Zunahme der freien Bestände um 2,6 Prozent gegenüber dem Vorjahr. 8,8 Prozent der Bestände waren Sanierungsbetriebe und 3,6 Prozent wurden in die Kategorie „sonstige Bestände“ eingeordnet.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis (Anzucht, PCR)	118
Untersuchungen zum Antikörpernachweis (5 unterschiedliche ELISA-Tests, SNT, Plaquereduktionstest)	4290

Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern 25

Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln) 61

Abgabe von Referenzmaterialien (Seren/Milchproben) 373

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BOVINE VIRUSDIARRHOE/ MUCOSAL DISEASE (NRL BVD/MD)

Schirrmeier, H.

Die Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD) ist seit November 2004 anzeigepflichtig. In der „Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV-Verordnung) vom 11. Dezember 2008, BGBl. 2008 Teil I Nr. 59, S 2461 v. 18. Dezember 2008 sind die Grundsätze einer bundeseinheitlichen Bekämpfung der BVD auf verpflichtender Grundlage geregelt, sie tritt ab dem 1.1.2011 in Kraft

Im TSN sind für das Jahr 2010 4.712 Fälle von BVD/MD ausgewiesen, das sind etwa dreimal so viele wie 2009. Der Anstieg ist in erster Linie auf im Vorfeld des Wirksamwerdens der Regelungen aus der BVD-VO über eine verpflichtende Untersuchung aller Kälber bis zum 6. Lebensmonat angestiegene Untersuchungszahlen sowie ein exakteres Anzeigeverhalten zumindest einiger Bundesländer zurückzuführen.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis (RT-/ PCR)	661
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	1568
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	60
Abgabe von Referenzmaterialien	~ 20

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BRUCELLOSE DER RINDER, SCHWEINE, SCHAFE UND ZIEGEN

Melzer, F., Neubauer, H.

Die Brucellose ist eine Infektionskrankheit, hervorgerufen durch Bakterien der Gattung *Brucella* (*B.*). Da der Erreger vom Rind (*B. abortus*), vom Schwein (*B. suis*), vom Schaf und von der Ziege (*B. melitensis*) und in eingeschränktem Maße auch vom Hund (*B. canis*) auf den Menschen übertragen werden kann, handelt es sich um eine Zoonose. Neben den genannten werden aktuell in der wissenschaftlichen Literatur folgende Spezies unterschieden: *B. ovis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* und *B. inopinata*.

Deutschland ist als offiziell frei von der anzeigepflichtigen Brucellose der Rinder, Schafe und Ziegen anerkannt. Hauptsymptome der Brucellose beim Tier sind Aborte, Frühgeburten oder die Geburt toter, lebensschwacher und unterentwickelter Tiere. Beim männlichen Tier kommt es oft zu entzündlichen Veränderungen im Bereich des Genitaltraktes, v. a. der Hoden und Nebenhoden.

Die Aufgabe des Referenzlabors umfasst insbesondere die Unterstützung der Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durch Abklärungsuntersuchungen bei positiven Befunden und die Zulassung bzw. Chargenprüfung von Diagnostika.

Im Rahmen der OIE-Referenzlabortätigkeit werden Abklärungsuntersuchungen bei positiven Befunden sowie Trainingskurse zur Brucellosediagnostik durchgeführt.

Im Jahr 2010 wurden zwei Brucellosefälle beim Rind in Niedersachsen angezeigt. In beiden Fällen basiert die Anzeige auf positiven serologischen Befunden. Ein bakteriologischer oder molekularbiologischer Erregernachweis liegt nicht vor. Die Infektion mit *Brucella ovis* beim Schaf wird als eine gesonderte Erkrankung (Ovine Epididymitis) behandelt und fällt nicht unter die Regelungen der Brucellose-Verordnung.

	Anzahl (ca.)
Untersuchungen zum Erregernachweis	40
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	200
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	36
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	12
Abgabe von Referenzmaterialien (Referenzseren, Antigene)	80

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BSE

Balkema-Buschmann, A., Fast, C., Eiden, M., Groschup, M.H.

Im nationalen Referenzlabor (NRL) für BSE wurden die praktischen Prüfungen im Rahmen der EU-weiten Evaluierungs- und Zulassungsverfahren (nach der EU-VO 999/2001) sowie der nationalen Zulassungsverfahren (nach der Tierimpfstoff-VO) für diagnostische Tests durchgeführt und hierzu gutachterliche Stellungnahmen verfasst. Dabei stützt sich das EU-Referenzlabor (Community Reference Laboratory, CRL) in Weybridge, Großbritannien, zunehmend auf die praktische Prüfung der Testkits in einem festgelegten NRL innerhalb der europäischen Union und informiert alle übrigen NRLs über das Ergebnis dieser Prüfung. Somit kann für viele der freizugebenden Schnelltest-Kit-Chargen die praktische Prüfung am FLI entfallen. Allerdings führt das FLI die europaweit gültige Chargenprüfung für den BioRad TeSeE-Schnelltest durch, der einer der am häufigsten verwendeten Tests (d. h. mehrere Millionen Tests pro Jahr) ist.

Proben mit verdächtigen BSE-Schnelltest-Ergebnissen werden im NRL mittels der OIE-anerkannten Bestätigungsmethoden (siehe OIE „Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals“) abgeklärt. Hierzu gehören histopathologische, immunhistochemische oder proteinbiochemische (OIE-SAF-Immunoblot) Verfahren. Die Zuverlässigkeit dieser Bestätigungsuntersuchungen am FLI wurde durch die Teilnahme an fünf Ringversuchen durch das CRL (ca. 2x pro Jahr und Testverfahren) und durch fortlaufende interne Kontrolluntersuchungen verifiziert.

Zu den Aufgaben des NRL für BSE gehört zudem die fachliche Begleitung und Überwachung der 21 staatlichen und privaten Labors, die amtliche Schnelltest-Untersuchungen durchführen. Hierzu wurde im Jahr 2010 u.a. ein BSE-Ringversuch durchgeführt. Die ausgezeichneten Ergebnisse in den Untersuchungseinrichtungen belegen den hohen diagnostischen Standard bei diesen Schnelltest-Untersuchungen.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	7
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	29
Abgabe von Referenzmaterialien	126

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR CAMPYLOBACTERIOSE (THERMOPHILE CAMPYLOBACTER)

Hotzel, H.

Durch Bekanntmachung vom 05. Dezember 2008, veröffentlicht im Bundesanzeiger vom 24. Dezember 2008, wurde das FLI als Betreiber des NRL für Campylobacteriose (thermophile Campylobacter), einer meldepflichtigen Tierkrankheit, benannt.

Thermophile *Campylobacter*-Spezies kommen bei vielen Tierarten und beim Menschen vor. Beim Menschen sind sie eine der Hauptursachen für infektiöse Darmerkrankungen. In Deutschland kommt die Campylobacteriose inzwischen häufiger vor als die Salmonellose. Auch bei Rind, Schaf, Schwein, Wildwiederkäuern, Hund, Katze und vor allem Geflügel besiedeln thermophile *Campylobacter*-Spezies die Darmschleimhaut, werden mit dem Kot ausgeschieden, verursachen jedoch nur selten Erkrankungen. Bei Jungtieren können die Bakterien Entzündungen des Verdauungstraktes mit Durchfällen auslösen. Außerdem führt der Erreger bei Säugern gelegentlich zu Aborten, beim Geflügel zu Leberentzündungen.

Thermophile *Campylobacter* benötigen zum Wachstum spezielle Nährmedien und eine mikroaerophile Atmosphäre. Nach der Anzucht werden sie biochemisch und molekularbiologisch identifiziert und typisiert. Ebenfalls möglich ist der molekularbiologische Direktnachweis von *Campylobacter*-Spezies aus verschiedenen Materialien.

Im Jahr 2010 wurde die Besiedlung von Putenherden durch thermophile *Campylobacter* untersucht. Angezüchtet wurden ausschließlich *Campylobacter jejuni*-Stämme. Auch im PCR-Direktnachweis aus Kot konnte *Campylobacter coli* nicht nachgewiesen werden. Die isolierten Stämme wurden mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden untersucht. Gegenstand der Untersuchungen war auch ihr Resistenzverhalten gegenüber Antibiotika.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	530

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR CAPRINE ARTHRITIS/ENZEPHALITIS UND MAEDI/VISNA

Vahlenkamp, T.W., Fichtner, D.

Das Caprine Arthritis-Enzephalitis Virus (CAEV) gehört in der Familie der *Retroviridae* zum Genus *Lentivirus* und ist der Erreger der Caprinen Arthritis-Enzephalitis (CAE), einer progressiv verlaufenden, chronischen Infektionserkrankung bei Ziegen. Das CAEV ist mit dem Maedi-Visna Virus (MVV) der Schafe nahe verwandt. Beide Viren besitzen ein gemeinsames Gruppenantigen. Die Inkubationszeit kann mehrere Jahre betragen. Nur etwa 30 Prozent der infizierten Tiere zeigen schließlich klinische Symptome. Ähnlich wie beim MVV kann die Übertragung des CAEV durch Milch, aber auch durch infizierte und virushaltige Sekrete der betroffenen Tiere erfolgen. In der Bundesrepublik bestehen in einzelnen Bundesländern freiwillige Bekämpfungsprogramme gegen CAE. Infektionen werden durch den Nachweis von Antikörpern gegen CAEV und MVV mittels ELISA nachgewiesen. Einsendungen von Geweben werden zur differentialdiagnostischen Abklärung in der Pathologie immunhistologisch untersucht.

	Anzahl
Untersuchungen zum Antikörpernachweis ELISA	69
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	5

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR ECHINOKOKKOSE

Conraths, F.J., Schwarz, S., Sutor, A.

Infektionen von Menschen mit dem Larvenstadium des Kleinen Fuchsbandwurms *E. multilocularis* gelten als die gefährlichste parasitär bedingte Zoonose Mitteleuropas. Infektionen bei Tieren mit *Echinococcus* spp. sind seit dem 9. November 2004 meldepflichtig (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten). *E. multilocularis* hat einen obligaten Wirtswechselzyklus. Infizierte Endwirte (*Canidae*, auch *Felidae*; in Europa vor allem der Fuchs und zunehmend auch der Marderhund) beherbergen wenige bis zu mehreren 100.000 geschlechtsreife, 1-3 Millimeter kleine Bandwürmer im Dünndarm und scheiden die auch für den Menschen infektiösen Eier mit der Losung aus.

Diese bleiben über Monate in der bodennah wachsenden Vegetation infektiös. Reguläre Zwischenwirte sind Nager, die sich durch orale Aufnahme der Eier infizieren und das Larvenstadium in nahezu allen Fällen in der Leber beherbergen. Der Lebenszyklus schließt sich über die Räuber-Beute-Beziehung der End- und Zwischenwirte.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	1.427
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	2

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR ENZOOTISCHE LEUKOSE DER RINDER

Vahlenkamp, T.W., Fichtner, D.

Das bovine Leukosevirus (BLV) gehört in der Familie der *Retroviridae* zum Genus *Delta-Retrovirus* und ist der Erreger der enzootischen Leukose der Rinder (enzootic bovine leukosis, EBL). Das Virus persistiert primär in B-Lymphozyten und zu geringeren Anteilen in CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten. Klinisch werden drei Verlaufsformen unterschieden: inapparente Infektion, persistierende Lymphozytose und tumoröse Leukose. Die Prävalenz der EBL ist in vielen Ländern Europas durch erfolgreiche serologische Sanierungsprogramme mittels ELISA und Agargelimmundiffusionstest zurückgegangen, allerdings ist die Infektion in Portugal, Ungarn, Bulgarien, Rumänien, Griechenland, Estland, Lettland, Litauen sowie in bestimmten Gebieten Italiens und Polens verbreitet. Außerhalb der EU ist die Erkrankung vor allem in Osteuropa, Asien, Australien sowie in Nord- und Südamerika von wirtschaftlicher Bedeutung. In diesen Ländern beträgt der Anteil infizierter Tiere in den Beständen z. T. bis zu 60 Prozent.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis (PCR)	29
Untersuchungen zum Antikörpernachweis (ELISA/AGID)	137/10
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	4/5
Abgabe von E05 OIE Referenzserum (int.)	14

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR EQUINE ENZEPHALOMYELITIDEN

Keller, M., Groschup, M.H.

Im NRL für Equine Enzephalomyelitiden werden Erkrankungen durch das Venezolanische Pferdeenzephalomyelitivirus (VEEV), das Östliche Pferdeenzephalomyelitivirus (EEEV) und das Westliche Pferdeenzephalomyelitivirus (WEEV) untersucht. Diese Arboviren gehören dem Genus *Alphavirus* der Familie *Togoviridae* an. Das Hauptreservoir dieser Viren bilden Vögel, bzw. im Falle des VEEV auch asymptomatisch infizierte kleine Säugetiere. Kommt es durch Stechmücken unterschiedlicher Spezies zur Infektion von Pferden und Menschen als sog. Fehlwirte, so erkranken diese mit zum Teil fatalem Ausgang.

Um eine Aussage über den serologischen Status eines eventuell infizierten Organismus machen zu können, wurden zwei ELISA-Testsysteme für EEEV und VEEV auf der Basis von inaktiviertem Vollvirus etabliert. Zum einen wurde ein IgM-ELISA auf Grundlage der im OIE-Referenzlabor in Ames/Iowa angewandten Methodik entwickelt. Mit diesem Test kann eine akute Infektion von Pferden mit EEEV bzw. VEEV nachgewiesen werden. Zum anderen wurde ein kompetitiver ELISA etabliert, der auch eine speziesübergreifende Diagnostik erlaubt. Mit beiden ELISAs wurden Pferdeseren aus verschiedenen Teilen Deutschlands getestet. Hierbei wurde wie erwartet kein positiver Befund erhoben. Eine Validierung beider Testsysteme anhand eines Panels bereits positiver bzw. negativer Seren (z. B. mittels PRNT) ist ebenso wie die Etablierung analoger Verfahren zum WEEV-Nachweis derzeit Gegenstand laufender Untersuchungen. Des Weiteren befinden sich ELISAs auf der Basis rekombinanter Hüll-Proteine der Viren in der Entwicklung.

Im Jahr 2010 erfolgte eine Einsendung an das NRL, welche vereinbarungsgemäß an das OIE-Referenzlabor in Ames/Iowa weitergeleitet wurde. Dort wurde die Probe negativ befundet. Mit den oben beschriebenen ELISA- und qRT-PCR-Testsystemen wurde dieses Ergebnis am FLI nachvollzogen.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR FILOVIREN (MARBURG/EBOLA)

Groschup, M.H., Balkema-Buschmann, A.

Das FLI fungiert als NRL für Filoviren (Marburg/Ebola) bei Tieren. Derzeit stehen für Arbeiten mit diesen BSL4-Erregern noch keine Arbeitsmöglichkeiten zur Verfügung. Dies wird im Neubau des FLI gewährleistet sein. In der Zwischenzeit wurden qRT-PCR-Nachweise für diese Erreger etabliert und

eine wissenschaftliche Zusammenarbeit mit dem Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg) und der CFIA (Winnipeg, Kanada) begonnen, so dass diagnostische Nachfragen im Rahmen dieser Kooperationen abgeklärt werden können.

NATIONALE REFERENZ-LABORATORIEN FÜR DIE FISCHSEUCHEN VHS, IHN, ISA, KHV-INFEKTION, EHN UND EUS

Fichtner, D., Bergmann, S.M., Kotterba, G., Schütze, H.

Die Nationalen Referenzlaboratorien (NRL) für Fischseuchen haben die Diagnose von Fischkrankheiten auf der Grundlage der Fischseuchen-Verordnung und der Gesetzgebung der Europäischen Union (EU) zu koordinieren und zu sichern.

Anzeigepflichtige Fischseuchen sind die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) und die Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN), zwei für Forellen bedeutsame Seuchen, die Infektiöse Anämie der Lachse (ISA) und die Koi-Herpesvirus (KHV)-Infektion (KHV-I) der Karpfen. Sie sind in der Liste der nicht-exotischen Krankheiten der Fische in der EU-Richtlinie 2006/88/EG aufgeführt. Anzeigepflicht besteht in Deutschland seit 2008 auch für die in der Liste der exotischen Fischkrankheiten dieser Richtlinie genannten Fischseuchen Epizootische Hämato-poetische Nekrose (EHN) und das Epizootische Ulzerative Syndrom (EUS), eine durch einen Pilz (*Aphanomyces invadans*) ausgelöste Krankheit der Fische.

2010 wurden in den NRL 45 Einsendungen untersucht (Anzahl der Proben und nachgewiesene Viren s. Tabelle).

In Deutschland wurden 2010 erneut 24 VHS-Neufeststellungen und 5 IHN-Neuaustritte angezeigt und im Tierseuchen-Nachrichtensystem (TSN) erfasst. Entsprechend den Vorschriften aus der Richtlinie 2006/88/EG erfolgten epizootiologische Untersuchungen auf der Grundlage der genetischen Analyse von Virusisolaten durch Sequenzierung ausgewählter Genombereiche zur Ermittlung der Verbreitungs- und Einschleppungswege von VHS- und IHN-Viren.

Das KHV verursacht weiterhin verlustreiche Krankheitsgeschehen bei Nutzkarpfen und Kois (*Cyprinus carpio*). 2010 wurden in Deutschland 110 Neuaustritte, davon 10 Fälle bei Nutzkarpfen inklusive eines Falles mit Beteiligung anderer Cypriniden, angezeigt.

Im NRL wurden weitere PCR-Methoden (*real-time PCR*, *semi-nested PCR*, Duplex-PCR) zum Nachweis des KHV-Genoms etabliert und validiert. Ergänzend zum KHV-Genomnachweis wurden Untersuchungen zum indirekten Nachweis der KHV-I durch Feststellung von Antikörpern durchgeführt. Ein ELISA zum Nachweis von KHV-Antikörpern wurde entwickelt.

Im Rahmen sero-epidemiologischer Untersuchungen zur Aufklärung der KHV-I-Situation in Deutschland erfolgte die Untersuchung von 638 Karpfenseren aus 5 Bundesländern auf Antikörper gegen KHV mittels Serum-Neutralisations-Test (SNT) und teilweise mittels ELISA. Erste Auswertungen zeigen, dass die KHV-Infektion in einigen Bundesländern Deutschlands mehr oder weniger weit verbreitet ist, dass aber auch noch zahlreiche KHV-freie Teichwirtschaften und Zonen existieren.

Bezüglich ISA ist Deutschland von der EU-Kommission als seuchenfrei erklärt worden.

Zum Nachweis der Erreger der exotischen Fischseuchen EHN und EUS sind die diagnostischen Methoden etabliert. Derzeit sind in Deutschland keine Fälle von EHN und EUS registriert.

Beim jährlichen Treffen der Vertreter der nationalen Referenzlaboratorien für Fischkrankheiten aus den Mitgliedsländern der EU wurde die Diagnostik und Kontrolle bedeutender Fischkrankheiten in Europa beraten. Hier wurde auch eine Analyse über Umfang und Struktur der Aquakultur, über Daten zur Epizootiologie, Diagnose und Bekämpfung der VHS, IHN, ISA, KHV-I und SVC sowie über Umfang und Ergebnisse der Laboruntersuchungen zu virusbedingten Fischkrankheiten in Deutschland vorgelegt. Beim anschließenden Workshop wurden diagnostische Verfahren zur Identifizierung der Erreger relevanter Fischkrankheiten durch Beiträge der NRL vorgestellt und diskutiert.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	815
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	321
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	1
Abgabe von Referenzmaterialien (Viren, Virus-DNA bzw. -RNA; IPNV-Antiserum)	45

Anm.: Untersuchungen umfassten Forellen (54x), Karpfen (642x), Kois (72x), Aal (10x), Stör (23x), Steinbutt (10x), Rotfeder (2x), Schleie (1x), Wels (1x). Neben VHSV, IHN, KHV und KHV-Antikörpern wurden in den Untersuchungen auch KPoV-Antikörper, Herpesviren vom Aal, Stör und Steinbutt sowie Pike Fry Rhabdovirus Aal-Picornavirus nachgewiesen

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR HANTAVIREN

Ulrich, R.G.

Hantaviren, Familie *Bunyaviridae*, sind Zoonoseerreger, die von persistent infizierten Nagetieren auf den Menschen übertragen werden. Daneben sind in den vergangenen Jahren eine Reihe von Insektenfresser-assoziierten Hantaviren entdeckt worden, deren mögliche Humanpathogenität bisher jedoch nicht geklärt ist. In Europa kommen mindestens drei humanpathogene, von Nagetieren übertragene Hantavirus-Spezies vor, die unterschiedlich schwere Verläufe eines hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom hervorrufen können. Der größte Teil der bisher in Deutschland gemeldeten humanen Hantavirus-Infektionen wurde durch das *Puumalavirus* (PUUV) verursacht. Weitere in Deutschland vorkommende Hantaviren sind das *Dobrava-Belgrad-Virus* (DOBV) und das *Tulavirus* (TULV). Bisher ist nicht bekannt, ob landwirtschaftliche Nutztiere durch Hantaviren infiziert werden können und erkranken. Zur Überwachung der Hantavirus-Situation wird im Rahmen des Netzwerkes „Nagetier-übertragene Pathogene“ in Zusammenarbeit mit zahlreichen Kooperationspartnern ein Monitoring von Nagetier-Reservoirwirten durchgeführt. Dieses Monitoring konzentriert sich insbesondere auf Wildnager aus PUUV-Ausbruchsgebieten in Baden-Württemberg, Bayern, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen sowie auch auf Gebiete in anderen Bundesländern. Nach einem serologischen Screening mittels IgG-ELISA unter Verwendung homologer rekombinanter Antigene erfolgt eine RT-PCR-Analyse von Lungenproben der Nagetiere mit anschließender Sequenzierung und phylogenetischer Analyse.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR INFEKTIÖSE ANÄMIE DER EINHUFER

König, P.

Die Infektiöse Anämie der Einhufer, auch bezeichnet als Equine Infektiöse Anämie (EIA) oder Ansteckende Blutarmut der Einhufer, ist eine weltweit auftretende Viruserkrankung der Pferde, Ponys, Esel, Maultiere und Zebras. Der Erreger (EIAV), ein Lentivirus aus der Familie der Retroviren, verursacht eine lebenslang persistierende Infektion. Die Diagnosestellung der EIAV-Infektion erfolgt durch den Nachweis von Antikörpern.

Zwischen 1966 und 2005 wurden in Deutschland nur vereinzelte Ausbrüche der infektiösen Anämie gemeldet.

Seit 2006 tritt die Krankheit häufiger auf. Allein im Jahre 2010 wurden 27 Fälle bzw. Ausbrüche registriert. Die meisten Fälle wurden durch Rückverfolgungen von Pferden aus Rumänien ermittelt. Bei diesen Pferden lagen jedoch teilweise die für eine Verbringung nach Deutschland erforderlichen Gesundheitszeugnisse und andere Dokumente (z. B. Identitätsnachweise) nicht vor oder waren möglicherweise gefälscht.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	22
Untersuchungen zum Antikörpernachweis AGID, ELISA (je zwei Hersteller)	448
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	12
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	4
Abgabe von Referenzmaterialien	4

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR JAPAN-ENZEPHALITIS-VIRUS (JEV)

Ziegler, U., Groschup, M.H.

Das Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV) gehört wie die Dengue-Viren, die Gelbfieber-Viren oder die West-Nil-Viren zur Familie der *Flaviviridae*. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen Plus-Strang-RNA von ca. 11 kb Länge. Auf dieser ist die Information für drei Strukturproteine (Kapsel-, Membran- und Hüllproteine) und sieben Nichtstrukturproteine (Enzyme) kodiert. Japanische Enzephalitis tritt nicht nur in Japan auf, sondern auch in anderen Ländern der gemäßigten und tropischen Zone Südost-Asiens. Jährlich sterben dort 30.000 bis 50.000 Menschen an solchen Infektionen. Schwerpunkte sind dabei ländliche Regionen mit Reisproduktion und Schweinezucht. Infektionen kommen aber auch in urbanen Regionen in entwickelten Ländern Asiens vor. Das Virus wird durch Mückenstiche übertragen. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht möglich. Das Virus befällt auch Haustiere wie Pferde, Schweine oder Hunde. Über 95 Prozent der Infektionen beim Menschen verlaufen asymptomatisch, fünf Prozent der Infizierten entwickeln Enzephalitiden (oft mit neurologischen Spätschäden), wovon jeder 200. Fall tödlich endet.

Das NRL konnte über Kooperationspartner weitere drei Serumproben von Pferden mit JEV Antikörpern für die Diagnostik erhalten. Dieses Referenzmaterial dient zunächst für serologische Spezifitätsprüfungen mit anderen

Flaviviren (z. B. WNV), soll aber auch perspektivisch mit geeigneten serologischen Methoden auf das Vorhandensein von JEV-Antikörpern untersucht werden. Derzeit wird ein Neutralisationstest etabliert. Ein quantitativer *real-time* RT-PCR-Assay befindet sich bereits seit 2009 am NRL im Einsatz.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR KLASSISCHE SCHWEINEPEST

Blome, S., Strebelow, G.

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine weltweit vorkommende, verlustreiche Tierseuche mit großer handelspolitischer und ökonomischer Relevanz. Sie zählt zu den Krankheiten, die bei der Weltorganisation für Tiergesundheit, dem Office International des Epizooties (OIE), und in allen europäischen Staaten anzeigepflichtig sind. Innerhalb der EU besteht seit 1990 ein striktes Verbot der prophylaktischen Impfung, wobei Notimpfungen durch die EU gestattet werden können. Die KSP wird durch ein kleines, behülltes RNA-Virus aus dem Genus *Pestivirus* hervorgerufen. Natürliche Wirte des Virus sind ausschließlich Haus- und Wildschweine. Da das klinische Bild sehr variabel sein kann, müssen zur Bestätigung der Erkrankung labordiagnostische Methoden verwendet werden. Die Aufgaben des Referenzlabors für Klassische Schweinepest (KSP) sind im Anhang III der EU Richtlinie 2001/89 festgelegt und ergeben sich darüber hinaus aus dem Tierseuchengesetz.

Im Jahr 2010 sind in Deutschland keine Schweinepestfälle registriert worden. Im Rahmen von Abklärungsuntersuchungen bei Wildschweinen wurde mehrfach der zur Impfung verwendete C-Stamm mittels spezifischer Real-time-RT-PCR und Sequenzierung nachgewiesen.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis Hausschweine / Wildschweine	0 / 47
Untersuchungen zum Antikörpernachweis Hausschweine / Wildschweine	4 / 12
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	34
Abgabe von Referenzmaterialien (Standardseren)	11

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR KONTAGIÖSE EQUINE METRITIS

Melzer, F., Raßbach, A.

Die Kontagiöse Equine Metritis (CEM: Contagious Equine Metritis) ist eine bakterielle Deckinfektion beim Pferd, hervorgerufen durch das Bakterium *Taylorella equigenitalis*. Das klinische Bild wird durch mukopurulenten Vaginalausfluss als Zeichen einer bestehenden Zervix- und Vaginalentzündung bei der Stute bestimmt und kann zu temporärer Infertilität führen. Auch wenn keine klinischen Zeichen auftreten, können die Tiere den Erreger ausscheiden und beim Deckakt auf den Hengst übertragen, der seinerseits asymptomatisch bleibt und die Infektion weiter übertragen kann. Die Diagnostik erfolgt durch den Nachweis des Erregers in Genitaltupferproben von Stuten und Hengsten. Für Exportuntersuchungen muss der Erregernachweis mittels klassischem bakteriologischem Verfahren erfolgen. Für Überwachungsuntersuchungen (z. B. vor der Zuchtsaison) wird zunehmend auch eine molekularbiologische Untersuchung akzeptiert. Im Jahr 2010 wurden fünf Bestände gemeldet, in denen bei je einem Pferd *T. equigenitalis* nachgewiesen wurde.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	2
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR KREBSTIERKRANKHEITEN

Fischer, U., Bergmann, S.M.

Das nationale Referenzlabor für Krebstierkrankheiten hat die Diagnose der Weißpünktchenkrankheit (White Spot Disease), des Taura-Syndroms und der Gelbkopfkrankheit (Yellowhead Disease) auf der Grundlage der Richtlinie 2006/88/EG des Rates vom 24. Oktober 2006 mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten (ABl. EU Nr. L 328 S. 14) sowie der Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (BGBl. I S. 2315) in Deutschland zu etablieren, zu koordinieren und abzusichern. Unterstützt wird das NRL für Krebstierkrankheiten des FLI durch das Referenzlabor der Europäischen Gemeinschaft (Community Reference



Laboratory, CRL) in Weymouth. Krebstierkrankheiten spielen in Deutschland gegenüber anderen melde- und anzeigepflichtigen Tierseuchen angesichts der nur dreizehn Betriebe, in denen Edelkrebse (*Astacus astacus*), Signalkrebse (*Pacifastacus leniusculus*) und Amerikanische Flusskrebse (*Orconectes limosus*) gehalten werden, eine bislang untergeordnete Rolle. Lediglich fünf Haltungen sind Haupterwerbsbetriebe. Die anzeigepflichtigen Krebstierkrankheiten sind weltweit jedoch von großer wirtschaftlicher Bedeutung in der Shrimphaltung. Diese soll in Deutschland in Warmwasseranlagen (Kraftwerke) stufenweise ausgebaut werden. Zudem stellen nicht überwachte und als Angelköder verwendete Shrimps eine Gefahr für die Krebstierpopulation in Wildgewässern und angeschlossenen Krebstierfarmen dar.

Das NRL für Krebstiererkrankungen hat die von der OIE vorgeschlagene und vom CRL bisher erarbeitete Diagnostik etabliert. Ende 2010 hat das CRL in Weymouth einen Workshop durchgeführt. In dessen Vorfeld hat das NRL des FLI erfolgreich an einem Ringtest teilgenommen. Die vom CRL erarbeiteten und empfohlenen Methoden sollen in die Diagnostik der Landesuntersuchungseinrichtungen überführt werden, vorzugsweise in solche, in deren Einzugsgebiet sich Krebstierzuchtanlagen befinden.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR KRIM-KONGO HÄMORRHAGISCHES FIEBER (CCHFV)

Balkema-Buschmann, A., Mertens, M., Groschup, M.H.

Das Krim-Kongo hämorrhagische Fieber Virus (CCHFV) ist ein Mitglied der Familie der *Bunyaviridae* und wird dem Genus *Nairoviren* zugeordnet. Das zu den Arboviren zählende, 80-120 nm große RNA-Virus wird von einem helikalen Kapsid umhüllt und hat ein in drei Segmente geteiltes Genom, welches in negativer Orientierung vorliegt. Die virale RNA kodiert für vier unterschiedliche Proteine: die Oberflächenproteine Gn und Gc, die Polymerase und das mit der RNA assoziierte Nukleokapsidprotein (N-Protein). Die Übertragung auf Tiere und auch den Menschen erfolgt durch bestimmte Zeckenarten oder durch den Kontakt zu Blut oder anderen Körperflüssigkeiten infizierter Tiere oder Menschen. Die Inkubationszeit liegt zwischen einem und sechs Tagen. Eine Übertragung durch direkten Kontakt mit Blut und Körperflüssigkeiten kann etwa ab dem fünften Tag nach der Infektion erfolgen.

Am nationalen Referenzlabor des FLI wurden 2010 keine diagnostischen Proben bearbeitet, da derzeit für Arbeiten mit diesem BSL4-Erreger noch keine Labormöglichkeiten zur Verfügung stehen. Dies wird erst im Neubau des FLI ab 2012 gewährleistet sein. In der Zwischenzeit wurden qRT-PCR-

Methoden für den Nachweis der Genome dieses Erregers etabliert und mit Versuchen zur Herstellung des N-Proteins von CCHFV in Hefe- und Bakterienzellen begonnen. Diese rekombinanten Proteine sollen zukünftig als Grundlage für die serologische Diagnostik dienen und den Nachweis von Antikörpern aus dem Blut von Menschen und Tieren ermöglichen.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR DIE LUNGENSEUCHE DER RINDER

Heller, M., Schubert, E.

Bei der Lungenseuche der Rinder handelt es sich um eine anzeigepflichtige, hochkontagiöse respiratorische Erkrankung der Rinder, die vor allem in afrikanischen Ländern des Subsahara-Gebietes zu gravierenden wirtschaftlichen Verlusten führt. Deutschland ist seit vielen Jahren frei von Lungenseuche. Die Erkrankung wird hervorgerufen durch das zellwandlose Bakterium *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type (*MmmSC*). Die amtliche Feststellung eines Lungenseucheausbruchs erfolgt ausschließlich über direkten Erregernachweis mittels kultureller Anzucht oder Genomnachweis durch PCR. Positive serologische Nachweise führen zum Verdacht. Laut OIE-Manual (Handbuch der OIE) sind Komplementbindungsreaktion und ein kompetitiver ELISA die vorgeschriebenen Verfahren zum spezifischen Antikörpernachweis. Im Berichtszeitraum erfolgte keine Einsendung von Verdachtsproben.

Im Rahmen des Verbundprojektes des Bundesministeriums für Bildung und Forschung zur Entwicklung eines chipbasierten Detektionssystems wurden die Arbeiten für den Vor-Ort-Nachweis des Lungenseucheerregers erfolgreich zu Ende geführt und dazu zwei schnelle PCR-Systeme auf einem neuem Biochip etabliert. In weniger als einer Stunde nach Probeneingang liegen die Ergebnisse vor, wobei die DNA-Extraktion eingeschlossen ist.

Des Weiteren wurde im Berichtszeitraum eine hochspezifische und sensitive Multiplex-Real-Time-PCR weiter entwickelt und validiert, die zukünftig die bisherigen konventionellen PCR-Tests in der Lungenseuchediagnostik ablösen soll. Sie basiert auf zwei Primerpaaren sowie entsprechenden TaqMan-Sonden für zwei unterschiedliche Targets. Die Reaktion wird als Multiplexassay mit einer dritten PCR als interne Amplifikationskontrolle kombiniert. Das Detektionslimit liegt bei 10 fg pro PCR-Reaktion, was etwa 10 *Mycoplasma*-Genomen entspricht.

Unter der Leitung des NRL wurde 2010 auch die Aktualisierung des bundeseinheitlichen Tierseuchenbekämpfungshandbuches im Rahmen der Task Force

Tierseuchenbekämpfung fortgeführt und ein Arbeitstreffen in Sababurg bei Kassel einberufen.

	Anzahl
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	498
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	3 / 5
Abgabe von Referenzmaterialien (Kontrollseren, Mykoplasma-Typstämme, Antisera)	32

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR MAUL- UND KLAUENSEUCHE, VESIKULÄRE SCHWEINEKRANKHEIT UND STOMATITIS VESICULARIS

Haas, B.

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine fieberhafte Allgemeinerkrankung der Klauentiere. Sie kommt noch in vielen außereuropäischen Ländern vor, insbesondere in der Türkei sowie in Asien, Afrika sowie Südamerika, und gehört wegen ihrer potentiell katastrophalen Auswirkungen auch heute noch zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Tierseuchen. Ihre besondere Bedeutung beruht auf ihrer hohen Kontagiosität sowie auf den wirtschaftlichen Verlusten infolge der zu ihrer Bekämpfung erforderlichen drastischen Sperr- und Kontrollmaßnahmen. Durch die Zunahme, Beschleunigung und Liberalisierung des internationalen Handels und Reiseverkehrs und die große Zahl der potentiellen Kontaktbetriebe bei der heutigen Struktur der Landwirtschaft sind die Bedingungen für eine Einschleppung und explosive Ausbreitung in Europa und damit auch in Deutschland jederzeit gegeben.

Im nationalen Referenzlabor für MKS werden gleichzeitig die Referenzlaboraufgaben für die differenzialdiagnostisch bedeutsamen Tierseuchen vesikuläre Schweinekrankheit (SVD) und Stomatitis vesicularis wahrgenommen. Die wichtigste Aufgabe des nationalen Referenzlabors für MKS ist die unverzügliche labordiagnostische Abklärung von MKS-Verdachtsfällen. Bei einem Ausbruch ist anschließend das isolierte Virus zu charakterisieren, um ggf. Empfehlungen für einen Impfstoff abgeben zu können. Wenn es gelungen ist, die Seuche zum Stillstand zu bringen, müssen serologische Untersuchungen die Entscheidungen über die Aufhebung von Sperrmaßnahmen unterstützen.

	Anzahl
Untersuchungen von Verdachtsfällen und zur Differentialdiagnose (Einsendungen/Proben)	14/77
Import/Export Status (Serologie) :	
MKS	66
SVD	322
Stomatitis vesicularis	427
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR MILZBRAND

Elschner, M.

Milzbrand ist eine durch das Bakterium *Bacillus anthracis* verursachte ansteckende und oft tödlich verlaufende anzeigepflichtige Tierkrankheit mit zoonotischem Potential. Gefährdet sind insbesondere pflanzenfressende Nutz- und Zuchttiere. Hauptinfektionsquellen sind die Sporen von *B. anthracis*, die von Tieren über das Futter aufgenommen werden. Beiden klinischen Verlaufsformen bei Mensch und Tier unterscheidet man abhängig von dem jeweiligen Eintrittsort Hautmilzbrand, Lungenmilzbrand oder Darmmilzbrand. Die Erkrankung kommt bevorzugt in wärmeren Klimazonen (Südosteuropa, Südamerika, Afrika, Südostasien) vor, in Deutschland dagegen nur noch sporadisch. Risikogebiete sind Flussniederungen, die häufigen Überschwemmungen ausgesetzt sind. Weitere Infektionsquellen sind tierische Rohprodukte ausländischer Herkunft wie beispielsweise trockene Häute oder Felle von Ziege, Schaf, Rind und Pferd und die von diesen Tieren gewonnenen Haare, Wolle oder Schweinsborsten. Der Erregernachweis erfolgt durch Anzucht mit nachfolgender Identifizierung der Virulenzplasmide mittels molekularbiologischer Methoden. Im Jahr 2010 erfolgte im Referenzlabor der Nachweis von *Bacillus anthracis* in humanen Proben. Der Patient hatte sich durch die Verabreichung kontaminierter Drogen infiziert. In Schottland und England wurden 2009 und 2010 ca. 30 ähnliche Fälle beschrieben.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	6
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	4
Abgabe von Referenzmaterialien	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR MUSCHELKRANKHEITEN

Bergmann, S. M., Fichtner, D.

Das Nationale Referenzlabor für Muschelkrankheiten (NRL-Mu) hat die Aufgabe, die Diagnose auf der Grundlage der deutschen Fischseuchen-Verordnung (Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008) und der Gesetzgebung der Europäischen Union (CD 2006/88/EC) zu koordinieren und zu sichern.

Anzeigepflichtige, nicht exotische parasitäre Erkrankungen der Muscheln sind die Bonamiose, verursacht durch *Bonamia ostrea* sowie die Marteiliose mit *Marteilia refringens* als auslösendes Agens. Für das Gebiet der EU exotisch sind die Infektionen mit den Parasiten *Bonamia exitiosa* (Australien), *Perkinsus marinus* (USA, Europa) und *Mikrocytos mackini* (USA).

Die Diagnose wird histologisch mit Abklatschpräparaten nach Hemacolor®-Färbung oder in HE-gefärbten Paraffinschnitten gestellt. Für die Bonamiose und die Marteiliose stehen dem NRL PCRs, *In-situ*-Hybridisierungen und andere akkreditierte Nachweistechiken zur Verfügung. Das NRL nahm erfolgreich an einem molekularbiologischen Ringtests mit je 30 DNA-Präparationen (Nachweis und Differenzierung von *Marteilia refringens* mittels PCR) teil. 2010 wurden 3 Einsendungen (histologische Präparate, Miesmuscheln, präpariertes Organmaterial) bearbeitet. In Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) aus dem Wattenmeer in Niedersachsen konnten, trotz histologischen Verdachts, keine anzeigepflichtigen Parasiten nachgewiesen werden.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	23

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR NEWCASTLE DISEASE (ND)

Grund, C.

Die Newcastle Disease ist eine hochkontagiöse Infektionskrankheit des Geflügels, die weltweit vorkommt und durch das Aviäre Paramyxovirus 1 (APMV-1) oder auch Newcastle Disease Virus (NDV) ausgelöst wird. Im Jahre 2010 wurden von 50 der 133 bei der OIE geführten Länder ND-Ausbrüche gemeldet.

In Deutschland wurde im Jahr 2010 ein ND-Ausbruch gemeldet. Es handelte sich um eine gemeinsame Haltung

von Wildtauben und Wachteln, bei der im Zuge eines Krankheitsgeschehens der Taubentyp des APMV-1 (PPMV-1) nachgewiesen wurde.

Insgesamt wurden im NRL 32 Proben von nationalen Untersuchungseinrichtungen auf das Vorliegen von Aviären Paramyxoviren (APMV) untersucht. In 27 Proben wurde APMV-1 nachgewiesen. Die von Geflügel isolierten Viren wurden als NDV-Impfstämme identifiziert und stammten von Hühnern (2) und Puten (2). Der überwiegende Teil der APMV-1-positiven Proben (21) stammte von Tauben aus Hobbyhaltungen und war dem Taubentyp zuzuordnen. Ebenfalls war ein APMV-1-Isolat einer Straßentaube als PPMV-1 zu charakterisieren. Eine Probe stammte von einem Wildvogel (Stockente; *Anas platyrhynchos*), bei der APMV-1 nachgewiesen wurde.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	32
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	27
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	3
Abgabe von Referenzmaterialien (Standardseren)	15

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR NIPAH- UND HENDRA-VIRUS

Balkema-Buschmann, A., Eiden, M., Groschup, M. H.

Infektionen mit Hendra-Virus und Nipah-Virus wurden in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts erstmals als Ursachen für respiratorische und neurologische Erkrankungen identifiziert, die bei einer Reihe von Tierspezies und beim Menschen in Australien, Malaysia, Bangladesch und Indien auftraten. Flughunde (Fruchtfledermäuse) der Gattung *Pteroptus* sind die natürlichen Wirte beider Viren.

Um mögliche Einsendungen von Proben von Exporttieren oder infektionsverdächtigen Tieren bearbeiten zu können, wurde am Nationalen Referenzlabor ein *real-time* RT-PCR-Protokoll (Wang *et al.*, 2001) etabliert, welches dem Nachweis des N-Gens dient. Des Weiteren wurde eine Kooperation mit dem australischen Referenzlabor am CSIRO in Geelong für Hendra-Erkrankungen initiiert. In diesem Rahmen wurde dem deutschen Referenzlabor ein ELISA zur Verfügung gestellt, um den diagnostischen Nachweis von Antikörpern gegen Hendra-Virus bei für den Export in bestimmte Regionen bestimmten Pferden oder bei infektionsverdächtigen Pferden erbringen zu können.

Diagnostische Einsendungen wurden im Jahr 2010 angesichts der noch nicht erfolgten Akkreditierung der Methoden nicht bearbeitet. Das NRL wurde in einem Fall kontaktiert, in dem bei für den Export nach Thailand bestimmten Rennpferden das Vorhandensein von Hendra-Virus-spezifischen Antikörpern ausgeschlossen werden sollte. Nach Diskussion mit den zuständigen Behörden in Deutschland und Thailand wurde auf die Untersuchung verzichtet, da eine Infektion mit diesem Virus in der EU bisher noch nicht vorgekommen ist und die Untersuchungen bisher nur vom australischen Referenzlabor durchgeführt werden können. Nach Etablierung der o. g. Methoden konnte das NRL erfolgreich an einem durch das australische Referenzlabor durchgeführten Ringversuch teilnehmen, so dass nun erstmals ein europäisches Labor zur Durchführung solcher Untersuchungen zugelassen werden kann.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR PARATUBERKULOSE

Köhler, H., Möbius, P.

Die Diagnostik der Paratuberkulose, einer chronisch verlaufenden, unheilbaren Darmentzündung der Wiederkäuer, erfolgt durch den kulturellen Erregernachweis in Kot- oder Organproben, durch Genomnachweis mittels PCR oder indirekt durch den Nachweis spezifischer Antikörper in Blutserum oder Milch. Die Aufgaben des Referenzlabors bestehen vor allem in der Sicherung der Qualität der verfügbaren diagnostischen Verfahren durch Ringversuche und die Prüfung der Methoden im Rahmen des amtlichen Zulassungsverfahrens und der Chargenfreigabe sowie in der Evaluierung und Implementierung neuer diagnostischer Methoden. Abklärungsuntersuchungen sind nur von untergeordneter Bedeutung. Seit 2010 sind in Deutschland vier kommerzielle ELISA-Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* zugelassen (Paratub. S und Paratub. B des Institut Pourquier, ID Screen Paratuberculosis Indirect der Firma ID Vet, CATTLETYPE MAP Ab der Firma Labor Diagnostik Leipzig, PARACHEK 2 der Firma Prionics).

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	204
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	10
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	28
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	1/9
Abgabe von Referenzmaterialien	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR PSITTAKOSE UND OIE-REFERENZLABOR FÜR CHLAMYDIOSE

Sachse, K., Schubert, E.

Eine Infektion mit dem Bakterium *Chlamydophila (C.) psittaci*, dem Erreger der Psittakose, kann bei Vögeln akut, protrahiert, chronisch oder subklinisch verlaufen. Es zeigen sich respiratorische Symptome und/oder Zeichen von Konjunktivitis, Schnupfen, Husten oder Dyspnoe. Latent infizierte Tiere können den Erreger intermittierend über Jahre ausscheiden ohne dabei selbst zu erkranken. Die Ansteckung des Menschen durch *C. psittaci* erfolgt hauptsächlich aerogen über Staub- und Tröpfcheninfektion, aber auch durch Kontakt zu infizierten Tieren.

Der Erregernachweis über die Anzucht wird nur noch von spezialisierten Laboratorien durchgeführt. Kommerzielle Antigen-ELISA-Tests für *C. psittaci* sind gegenwärtig nicht verfügbar. Es werden auf Real-Time-PCR basierende validierte Tests eingesetzt, die hinsichtlich der Spezifität der kulturellen Anzucht ebenbürtig und meist sensitiver sind. Die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Nachweistests für *Chlamydiaceae* und *C. psittaci* wurde durch einen Ringversuch mit 29 Teilnehmern erneut bestätigt.

Bei den am NRL bearbeiteten Psittakoseverdachtsproben handelt es sich einerseits um Einsendungen der Untersuchungsämter zur Abklärung. Darüber hinaus wurde eine Feldstudie über das Vorkommen von Chlamydien in Stadttauben unterstützt, indem die diagnostischen Arbeiten vom NRL durchgeführt wurden.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis Psittakoseverdacht	557
Untersuchungen zum Antikörpernachweis diagnostische Proben (<i>Chlamydiaceae</i>)	7396
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern (Anzucht Zellkultur)	71
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	1/2
Abgabe von Referenzmaterialien (DNA / Stammkulturen)	56 / 6



NATIONALES REFERENZLABOR FÜR Q-FIEBER (*COXIELLA BURNETII*)

Henning, K.

Unter der Bezeichnung Q-Fieber (Coxiellrose) werden Infektionen mit dem Bakterium *Coxiella burnetii* verstanden. Das Q-Fieber zählt zu den meldepflichtigen Tierseuchen. Die Krankheitserscheinungen beim Tier sind meistens gering. Seine Hauptbedeutung hat der Erreger als Auslöser von Unfruchtbarkeit und Aborten beim Wiederkäuer. Q-Fieber zählt außerdem zu den Zoonosen. Als labordiagnostischer Nachweis gilt ein positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden: gefärbtes Ausstrichpräparat, Erregerisolierung (z. B. über Zellkultur) oder PCR (direkter Erregernachweis). Der indirekte (serologische) Nachweis erfolgt mittels ELISA. Der serologische Nachweis für sich allein ergibt nicht den geforderten labordiagnostischen Nachweis einer bestehenden Q-Fieber-Infektion. Zusätzlich zu den unten aufgeführten Einsendungen wurden 5.957 Seren für eine Seroprävalenzstudie eingesandt. Diese sind zurzeit noch in Bearbeitung.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	1654
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	3125
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern (Anzucht)	12
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	3

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR RAUSCHBRAND

Seyboldt, C.

Der Rauschbrand ist eine seuchenhaft und akut verlaufende, infektiöse, aber nicht kontagiöse Gasödemkrankheit, die meist junge Rinder sowie gelegentlich Schafe bzw. Ziegen befällt. Infektionen mit diesem Erreger (*Clostridium (C.) chauvoei*) sind anzeigepflichtig. *C. chauvoei* muss von anderen Gasödemerregern, insbesondere von *C. septicum*, dem Erreger des Pararauschbrandes, abgegrenzt werden. Weitere Clostridienspezies sind differentialdiagnostisch zu berücksichtigen. Die Abgrenzung von *C. chauvoei* und *C. septicum* mit traditionellen mikrobiologischen Methoden ist problematisch, da sich die beiden Erreger in vielen Eigenschaften gleichen. Eine Differenzierung von Isolaten

kann durch die Prüfung von biochemischen Eigenschaften („bunte Reihe“) unter anaeroben Bedingungen erfolgen. Weitere Möglichkeiten zur Identifikation von *C. chauvoei* sind die direkte Immunfluoreszenz sowie der Nachweis durch PCR-Methoden.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	148

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR RIFTTALFIEBER-VIRUS

Balkema-Buschmann, A., Eiden, M., Groschup, M.H.

Das Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) gehört zur Familie der Bunyaviren, Genus *Phlebovirus*, und tritt nur in einem Serotyp auf. Der Erreger, welcher bis jetzt nur in Afrika sowie auf der arabischen Halbinsel nachgewiesen wurde, wird durch Stechmücken v. a. der Gattungen *Aedes* und *Culex* übertragen und verursacht subklinische Infektionen bis hin zu perakuten Erkrankungen mit tödlichem Ausgang bei Mensch und Tier. Unter bestimmten klimatischen Bedingungen wird die Vermehrung der Vektoren begünstigt, was ein gehäuftes Auftreten von RVF-Infektionen zur Folge hat. Kennzeichnend für die Erkrankung sind hämorrhagisches Fieber sowie eine hochgradige Leberschädigung. Besonders empfänglich sind Hauswiederkäuer (Schaf, Ziege, Rind); die Infektion manifestiert sich bei diesen in Form von hohen Abortraten und einer hohen Mortalität bei Neugeborenen. Ältere, nicht-tragende Tiere besitzen eine gewisse Resistenz gegenüber einer Infektion. Menschen infizieren sich mit RVF-Viren durch den Kontakt mit Fleisch oder Milch infizierter Tiere oder durch Insektenstiche.

Im NRL für RVF wurden im Jahr 2010 die vorhandenen diagnostischen Methoden etabliert und optimiert. Um die Abhängigkeit von kommerziell erhältlichen ELISAs, die sich im Test als nicht zufriedenstellend erwiesen, zu minimieren, wurde ein „In-house“-ELISA von im NRL entwickelten rekombinanten Antigenen (N-, G1-, G2-Proteine) und zugehöriger Antiseren entwickelt. Erste Ergebnisse hierzu sind vielversprechend. Im Sinne einer fundierten Validierung dieser ELISAs wurden Kooperationen mit verschiedenen Instituten in Afrika (Tansania, Senegal, Südafrika, Äthiopien) initiiert, die auch projektbezogene wissenschaftliche Zusammenarbeiten einschließen. Im Jahr 2010 wurden im NRL keine diagnostischen Einsendungen bearbeitet.

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR ROTZ

Elschner, M., Neubauer, H.

Rotz ist eine durch das Bakterium *Burkholderia mallei* verursachte, akut, chronisch oder latent verlaufende anzeigepflichtige Infektionskrankheit der Einhufer mit zoonotischem Potential. Die Erkrankung tritt in Teilen Asiens und Südamerikas endemisch auf, dagegen gilt sie in Westeuropa als getilgt. Deutschland ist seit 1956 frei von dieser Tierseuche. Für Infektionen sind besonders Esel und Maultiere empfänglich. *B. mallei* wird von infizierten Tieren mit allen Körpersekreten ausgeschieden. Die Übertragung erfolgt ausschließlich horizontal durch direkten oder indirekten Kontakt mit infizierten Tieren oder kontaminierten Gegenständen. Klinische Verlaufsformen sind Hautrotz, Nasenrotz und Lungenrotz. Auf der Basis der Entscheidung 93/197/EWG der Kommission über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen und die Beurkundung für die Einfuhr von registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden sind für Equiden aus bestimmten Drittländern serologische Untersuchungen mittels KBR gefordert. Die Aufgabe des Referenzlabors umfasst insbesondere die Unterstützung der Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durch Abklärungsuntersuchungen bei positiven KBR-Befunden und die Zulassung bzw. Chargenprüfung von Diagnostika. Im Rahmen der OIE-Referenzlabortätigkeit werden Abklärungsuntersuchungen bei positiven KBR-Befunden sowie Trainingskurse zur Rotzdiagnostik durchgeführt.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	48
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	832
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	14
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	2
Abgabe von Referenzmaterialien	9

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR SALMONELLOSE DER RINDER

Methner, U.

Die Salmonellose der Rinder ist, in Abhängigkeit vom verursachenden *Salmonella*-Serovar, eine perakut bis chronisch oder symptomlos verlaufende Erkrankung, die meist bei Kälbern und bei Kühen um den Zeitpunkt des Abkalbens auftritt. Sie ist durch das Auftreten von Durchfällen mit Todesfällen, Bronchopneumonien, Arthritiden und Aborten ab dem 7. Trächtigkeitsmonat gekennzeichnet. Die Serovaren *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Dublin verursachen 70-80 Prozent der angezeigten Rinder-Salmonellose-Ausbrüche in Deutschland. *Salmonella* Abortus-bovis, *Salmonella* Enteritidis sowie weitere, häufig wechselnde Serovaren sind für ca. 20-30 Prozent der Ausbrüche verantwortlich. Die Tiergesundheitsjahresberichte des FLI geben einen Überblick über die epidemiologische Situation der Salmonellose der Rinder in Deutschland.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	421
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	64
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	4 / 24
Abgabe von Referenzmaterialien	3

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR SCRAPIE

Fast, C., Balkema-Buschmann, A., Eiden, M., Groschup, M.H.

Im Jahr 2010 wurden insgesamt zwölf Scrapie-Ausbrüche bei Schafen diagnostiziert. Dabei handelte es sich bis auf einen klassischen Scrapie-Fall um Fälle atypischer Scrapie bei Schafen. In einem von atypischer Scrapie betroffenen Bestand wurde im Abstand von drei Monaten ein zweiter Fall nachgewiesen. Seit Einführung der aktiven amtlichen TSE-Untersuchungen für kleine Wiederkäuer im Jahre 2002 wurden damit insgesamt 310 Scrapie-Fälle bei Schafen, aber kein einziger Fall bei einer Ziege festgestellt. Das NRL begleitete die Schnelltest-Untersuchungen durch die fachliche Beratung der insgesamt 19 staatlichen und privaten Schnelltestlabors, durch praktische Untersuchungen und durch die Chargen-Prüfungen der verwendeten Schnelltests.

Ferner wurde die Performance der Schnelltestlabors im Rahmen eines verblindeten Ringversuches getestet.

In Schnelltests verdächtige Proben wurden mittels der vom OIE anerkannten Bestätigungstests abgeklärt. Weiterhin wurde der im Jahr 2010 diagnostizierte klassische Scrapie-Fall gemäß den Vorgaben durch die EU-Verordnung 214/2005 mittels des sog. FLI-Tests weiteruntersucht, einem in der EU offiziell zugelassenen Diskriminierungstest, der am FLI entwickelt wurde, um eine mögliche BSE-Infektion bei kleinen Wiederkäuern aufzudecken. Auf Grundlage der Erkenntnisse zur genetischen Scrapie-Resistenz und ihrer Bedeutung bei der Verhütung, Kontrolle und Tilgung dieser Infektionskrankheit wurde die Bestimmung des Genotyps sämtlicher TSE-Fälle bei der Firma Agrobiogen, Hilgertshausen, durchgeführt. Die Genotypen der betroffenen Tiere wurden den zuständigen Länderbehörden zeitnah mitgeteilt.

Das NRL stand wieder in engem wissenschaftlichem Kontakt mit den NRLs der anderen EU-Mitgliedstaaten und dem CRL am VLA Weybridge. Hierzu gehörte auch die aktive Mitarbeit in der sog. Strain-Typing Expert Group (STEG) des CRL.

Kleine Wiederkäuer (nur Schafe)	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	25
Typisierungen und molekularbiologischen Charakterisierungen von Erregern	2
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	9 **
Abgabe von Referenzmaterialien	114

* davon zwei Fälle im gleichen Bestand

** gelistet sind nur die Chargenprüfungen für Tests, die zur Untersuchung von Proben kleiner Wiederkäuer zugelassen sind. Testverfahren zur Untersuchung von Rinderproben und Proben kleiner Wiederkäuer sind bei den BSE-Schnelltests aufgeführt.

WHO COLLABORATING CENTRE FOR RABIES SURVEILLANCE AND RESEARCH; OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR TOLLWUT

Müller, T., Freuling, C.

Die Erreger der Tollwut sind Einzelstrang-RNA-Viren negativer Polarität, die zum Genus *Lyssavirus* der Familie der *Rhabdoviridae* gehören. Drei der bislang sieben bekannten Genotypen (GT) kommen in Europa vor. Dazu gehören die

Genotypen 1 (*Rabies Virus*, RABV), 5 und 6 [European bat lyssavirus 1 & 2 (EBLV-1 & 2)], für die Karnivoren bzw. Fledermäuse als Hauptreservoir fungieren. Seit 2008 gilt Deutschland wie viele andere west- und mitteleuropäische Länder bereits auch offiziell als tollwutfrei (Freiheit von klassischer Tollwut, RABV).

Die Aufgaben des nationalen und OIE-Referenzlabors für Tollwut leiten sich aus der Tollwut-Verordnung (TW-VO) vom 11. April 2001 (BGBl. I 2001 S. 598) in Verbindung mit der Entscheidung BMELV vom 08. Juli 1997 sowie den Entscheidungen des OIE (1992) ab. Die Aufgaben als WHO CC wurden mit der Bestätigung der Redesignierung durch die WHO vom 16. Juli 2008 definiert.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	451
Untersuchungen zum Antikörpernachweis RFFIT/FAVN (OIE-Empfehlung)	362
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	4
Abgabe von Referenzmaterialien	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR DIE TRICHOMONADENSEUCHE DES RINDES

Henning, K.

Die Trichomonadenseuche des Rindes ist eine durch den einzelligen Parasiten *Trichomonas foetus* hervorgerufene Deckinfektion des Rindes. Sie zählt zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Der Erreger wird beim Deckakt übertragen. Im Anschluss an eine Infektion besiedeln die Trichomonaden beim Bullen die Präputialhöhle, den Penisgraben und die Mündung der Harnröhre. Infizierte Bullen zeigen oft nur leichte oder überhaupt keine Symptome. Bei Kühen werden Vagina und Uterus besiedelt. Die Infektion führt hier zu Vaginitis, Endometritis und Aborten. Als Komplikation können bakterielle Begleitinfektionen auftreten. Wie erst seit wenigen Jahren bekannt ist, kommen *T. foetus* oder *T. foetus*-verwandte Flagellaten auch im Intestinaltrakt des Hundes und der Katze vor und stehen im Verdacht, bei diesen Tieren Durchfallerkrankungen zu verursachen.

Als labor diagnostischer Nachweis gilt ein positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden: Mikroskopischer Nachweis (z.B. Dunkelfeld-Mikroskop, gefärbtes Ausstrichpräparat), Anzucht des Erregers oder Nachweis mittels

PCR. Problematisch ist die Verwechslungsmöglichkeit von *T. foetus* mit anderen Trichomonaden. Hierbei spielen insbesondere Kontaminationen mit Flagellaten aus dem Darmtrakt eine Rolle.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis <i>T. foetus</i> beim Rind	1
Trichomonaden bei Vögeln	3
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR TOXOPLASMOSE

Schares, G.

Die Toxoplasmose ist eine durch den sich obligat intrazellulär vermehrenden einzelligen Parasiten *Toxoplasma gondii* hervorgerufene Infektionserkrankung. Sie zählt zu den meldepflichtigen Tierseuchen. Feliden sind Endwirte von *T. gondii*; diese können im Kot umweltresistente Stadien (Oozysten) ausscheiden. In Zwischenwirten persistiert *T. gondii* lebenslang und bildet dabei Gewebezysten aus. Infektionen des Menschen werden vor allem verursacht durch den Verzehr von rohem oder nicht ausreichend erhitztem Fleisch infizierter Zwischenwirte, das lebende Stadien von *T. gondii* enthält, oder durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln oder Wasser, kontaminiert mit Oozysten aus dem Kot infizierter Feliden. Bei vielen Tierarten verlaufen die meisten Infektionen mit *T. gondii* symptomlos. Bei Schafen und Ziegen kann die Infektion mit *T. gondii* zu Aborten führen. Bei bestimmten Tierarten, die hierzulande in Zoos gehalten werden, aber auch bei bestimmten einheimischen Wildtieren kann es zu schweren Infektionsverläufen kommen, die mit dem Tod der Tiere enden. Die meisten Primärinfektionen beim Menschen sind asymptomatisch; manche Patienten erkranken an einer Lymphadenopathie oder einer okulären Toxoplasmose. Eine primäre, während der Schwangerschaft erworbene Infektion kann den Föten schwer schädigen. Bei immunsupprimierten Patienten kann eine Reaktivierung latenter Infektionen zu lebensbedrohlichen Enzephalitiden führen. Labordiagnostisch lassen sich Infektionen direkt mikroskopisch bei der histologischen oder bei der koproskopischen Untersuchung oder durch Erregerisolierung nachweisen. Allerdings ist bei diesen Verfahren eine anschließende Bestätigung der Erregeridentität mittels PCR erforderlich. Über spezifische Antikörper gegen Tachyzoitenstadien von *T. gondii* (z.B. im Immunfluoreszenztest, im ELISA, im Westernblot

oder im Agglutinationstest) können Infektionen indirekt nachgewiesen werden.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	158
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	437
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	26
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	2
Abgabe von Referenzmaterialien	5

NATIONALES VETERINÄR-MEDIZINISCHES REFERENZLABOR FÜR TUBERKULOSE

Moser, I.

Die Tuberkulose ist eine chronisch verlaufende Infektionskrankheit bei Mensch und Tier (Zoonose), die durch granulomatöse Veränderungen der betroffenen Organe charakterisiert ist und oft tödlich endet. Sie zählt zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Deutschland ist seit vielen Jahren amtlich frei von Tuberkulose, dennoch wurden im Jahr 2010 elf Ausbrüche diagnostiziert. Die Erreger der Tuberkulose bei Mensch und Tier werden im *Mycobacterium (M.) tuberculosis*-Komplex (MTC) zusammengefasst. Nicht zum MTC gehörende Mykobakterien (*M. avium* und andere atypische Mykobakterien) sind meist weniger pathogen für Mensch und Tier (Ausnahme: jeweilige Primärwirte). Bei der Diagnostik gilt noch immer die Kultivierung als sicherste und sensitivste Nachweismethode („Goldstandard“). Um die relativ lange Zeit bis zur Diagnosestellung abzukürzen, kann die mykobakterielle DNA mittels PCR direkt in Organextrakten nachgewiesen werden. Dabei wird im Referenzlabor und in den Landesuntersuchungsämtern ein am FLI entwickeltes *real-time* PCR-System verwendet. Der PCR-Befund wird durch Anzüchtung des Erregers bestätigt. Zur weiteren Typisierung werden verschiedene molekularbiologische Methoden (Spoligotyping, VNTR-Typing, DNA-Sequenzanalyse) angewandt. Der Nachweis und die Typisierung von Mykobakterien in eingesandten Verdachtsproben (Bestätigung, Abklärung), molekular-epidemiologische Untersuchungen sowie immunologische Nachweisverfahren (Gamma-Interferon-Test) machen einen wesentlichen Teil der Arbeit des Referenzlabors aus. Außerdem leitet das Referenzlabor zusammen mit der Arbeitsgruppe für Internationale Tiergesundheit zwei

internationale Kooperationsprojekte zur Rindertuberkulose in Afrika.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis (Gewebeproben, Isolate)	348
Abgabe von Referenzmaterialien	1

NATIONALES REFERENZ-LABORATORIUM FÜR TULARÄMIE

Tomaso, H.

Die Tularämie (Hasenpest) ist eine Infektionskrankheit hervorgerufen durch *Francisella (F.) tularensis*. Es handelt sich dabei um gramnegative, unbewegliche, aerob wachsende Bakterien. Sie bilden keine Sporen, sind aber dennoch gegenüber äußeren Bedingungen sehr widerstandsfähig. Betroffen sind in Deutschland vorwiegend Nagetiere, Hasen und Wildkaninchen, aber auch eine Vielzahl anderer Tiere einschl. Vögel mit unterschiedlicher Empfänglichkeit. Krankheit und Nachweis des Erregers der Tularämie sind bei Hasen und Kaninchen meldepflichtig (Neufassung der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 20. Dezember 2005).

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	372
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	136
Typisierungen und molekularbiologische Charakterisierungen von Erregern	131
Abgabe von Referenzmaterialien	23

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR VIBRIONENSEUCHE DER RINDER

Müller, W.

Campylobacter (C.) fetus subsp. *venerialis* ist der Erreger der bovinen genitalen Campylobacteriose (bgC) - früher, aber auch noch in der Neufassung der Rinder-Deckinfektionen-Verordnung vom 20. Dezember 2005 als Vibriose der Rinder bezeichnet. Diese venerische Infektionskrankheit der Rinder ist eine anzeigepflichtige Tierseuche und durch Infertilität, frühe embryonale Mortalität und Abort charakterisiert. Das verursachende Bakterium besitzt

einen ausgeprägten Tropismus für die Genitalschleimhaut des Rindes (enzootischer Abort). Ein eng verwandter Mikroorganismus ist die zweite Subspezies von *C. fetus*. Dieser Keim, *C. fetus* subsp. *fetus*, hat sein natürliches Erregerreservoir im Intestinaltrakt des Rindes, doch ist auch er in der Lage, Aborte zu verursachen (sporadischer Abort). Die unterschiedliche klinische Bedeutung der beiden Subspezies erfordert deren exakte Identifizierung.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	7
Abgabe von Referenzmaterialien	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR WEST-NIL-VIRUS

Ziegler, U., Groschup, M.H.

West-Nil-Virus (WNV) ist ein Arbovirus innerhalb der Gattung *Flavivirus* in der Familie der *Flaviviridae*. Es gehört zur Gruppe der Japan-Enzephalitis-Viren, wird durch Moskitos übertragen und besitzt ein hohes zoonotisches Potential. Infizierte Wildvögel fungieren als Virusreservoir. Durch veränderte Klimabedingungen und die bereits vorhandenen Hauptvektoren des WNV (*Culex pipiens*-Stechmücken) im Süden Deutschlands ist nicht auszuschließen, dass sich dieser Erreger nach einem Eintrag halten und verbreiten kann. Gleichzeitig zeigt der Ausbruch von WNV bei Wildvögeln in Österreich im Herbst 2008 und bei Pferden in Italien seit 2008, dass sich das Virus immer weiter nordwärts ausbreitet. Im Jahr 2010 kam es zum vermehrten Auftreten von WNV-Erkrankungsfällen bei Menschen in Süd- und Südosteuropa (Griechenland, Russland, Rumänien, Ungarn, Italien und Israel). Hierbei waren auch Pferde und Wildvögel betroffen.

Das durchgeführte dreijährige aktive Überwachungsprogramm an Hunderten von Proben von Vögeln und Pferden am FLI wurde Mitte 2010 beendet. Im Ergebnis dieser Studie konnten WNV-spezifische Antikörper nur bei mittel- bis langstreckenziehenden Zugvögeln nachgewiesen werden. Bei den einheimischen Standvögeln, Wirtschaftsgeflügel in Freilandhaltung oder bei Pferden gab es keine Antikörperfunde. Ebenso wenig wurden WNV-spezifische Nukleinsäuren in den untersuchten Proben nachgewiesen.

Erste Studien zur Etablierung eines geeigneten Mausmodells zur Phänotypisierung von verschiedenen WNV-Stämmen wurden an Wildtyp- bzw. gentechnisch veränderten Mäusen durchgeführt. Gleichzeitig wurden Infektionsstudien an Falken begonnen, die mit zwei unterschiedlichen Viren der WNV-Linie 1 und 2 infiziert wurden. Diese Greifvogelstudien

werden 2011 unter der Thematik „Wirksamer Schutz vor einer WNV-Infektion durch Einsatz von geeigneten Vakzinen“ weitergeführt.

Ein kompetitiver ELISA zum Nachweis von IgG-WNV-Antikörpern bei Pferden, Hühnern, Enten und Gänsen wurde für Deutschland 2010 zugelassen. Ein weiterer ELISA zum Nachweis von IgM-Antikörpern bei Pferden befindet sich noch in der nationalen Zulassung.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	11
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	9
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	2 / 3

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR DURCH ZECKEN ÜBERTRAGENE KRANKHEITEN

Süss, J., Klaus, C.

Das Nationale Referenzlabor für durch Zecken übertragene Krankheiten (NRL-ZüK) befasst sich sowohl mit der Biologie und Populationsdynamik der Zecke als Vektor als auch mit den durch Zecken übertragenen Krankheiten, wobei Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und Lyme Borreliose (LB) als die in Deutschland wichtigsten viralen bzw. bakteriellen durch Zecken übertragenen Krankheiten bei Mensch und Tier im Vordergrund stehen. Weitere durch Zecken übertragene Erkrankungen sind z. B. Babesiose, Anaplasmose und weitere Rickettsiosen, deren Bedeutung gegenwärtig immer noch als gering eingeschätzt wird. FSME kann neben den bekannten humanmedizinischen Erkrankungen mit ähnlichem klinischem Bild auch bei Hunden, Pferden und Affen auftreten. Schafe, Ziegen und Rinder können das Virus nach Zeckenstichexposition auch über die Milch ausscheiden, ohne dabei selbst erkennbar klinisch zu erkranken. Der Genuss dieser Milch in unpasteurisierter Form kann beim Menschen die sog. alimentäre FSME hervorrufen, die klinisch nicht von einer Erkrankung nach Zeckenstichexposition zu unterscheiden ist. Bei den o. g. Tierarten können Antikörper über einen längeren Zeitraum im Serum nachgewiesen werden.

Erkrankungen durch *Borrelia burgdorferi* s.l. als Erreger der LB treten beim Menschen sehr häufig auf, bei Pferden, Rindern und Hunden ebenso. Die Bedeutung der LB bei Schafen, Ziegen und Katzen ist bisher unklar. Vögel können als Reservoirwirte für *Borrelia burgdorferi* dienen, klinische Erkrankungen wurden bisher nicht nachgewiesen.

Die Aufgaben des NRL-ZüK umfassen Beratungen und Vorträge zu FSME, Borreliose und anderen durch Zecken übertragenen Krankheiten einschließlich Zeckenstichprophylaxe, FSME-Virusnachweise in Zecken (*real-time* RT-PCR) sowie in Liquor- und Serumproben. Die Isolierung, Charakterisierung und komplette Sequenzierung von FSME Viren dient u. a. der Risikobewertung. Nachweise spezifischer FSMEV-Antikörper bei Haus- und Weidetieren, Unterstützung bei der Abklärung von Borrelioseverdachtsfällen durch Antikörpernachweis (ELISA, Westernblot). Komplexe Untersuchungen dienen der Charakterisierung von FSME-Naturherden und damit von Risikogebieten für Mensch und Tier.

Die laborseitige Bearbeitung und Bewertung von veterinärmedizinischen Diagnostika (Zulassungen, Chargenprüfungen) für durch Zecken übertragene Krankheiten ist eine wesentliche Referenzaufgabe.

	Anzahl
Untersuchungen zum Erregernachweis	218
Untersuchungen zum Antikörpernachweis	6677
Zulassungs- und Chargenuntersuchungen im Rahmen von §17 c Tierseuchengesetz (Zulassung von diagnostischen Mitteln)	12
Abgabe von Referenzmaterialien	3

3 RECHTLICHE GRUNDLAGEN DER TIERSEUCHENBEKÄMPFUNG:

Das Tierseuchengesetz (TierSG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004 (Bundesgesetzblatt I Seite 1260) ist in der Bundesrepublik Deutschland die Grundlage für die staatliche Bekämpfung von Tierseuchen. Das Tierseuchengesetz enthält Vorschriften für die Ein-, Durch- und Ausfuhr von Tieren, tierischen Erzeugnissen und Rohstoffen und dient insoweit der Abwehr der Einschleppung von Tierseuchen aus dem Ausland. Außerdem enthält es Vorschriften für die Bekämpfung der Tierseuchen im Inland. Die Maßnahmen zur Abwehr der Einschleppung von Tierseuchen aus dem Ausland und zur Vorbeuge und Tilgung der Tierseuchen im Inland ergänzen sich gegenseitig.

Auf europäischer Ebene regelt das **EU-Recht zur Tiergesundheit** die Bekämpfungsmaßnahmen zu den wichtigsten Tierseuchen und die entsprechenden Tilgungs- und Überwachungsprogramme. Die Durchführung der gesetzlich vorgesehenen Maßnahmen liegt in der Verantwortung der Mitgliedstaaten.

Die wichtigsten Richtlinien der EU zur Tiergesundheit sind:

- RL 2003/99/EG zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates, zuletzt geändert durch RL 2006/104/EG

- RL 2006/88/EG mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten
- RL 82/894/EWG über die Mitteilung von Viehseuchen in der Gemeinschaft, zuletzt geändert durch die Entscheidung 2008/650/EG
- RL 92/119/EWG mit allgemeinen Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung bestimmter Tierseuchen sowie besonderen Maßnahmen bezüglich der vesikulären Schweinekrankheit, zuletzt geändert durch RL 2008/73/EG

Auf internationaler Ebene sind durch die **Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE)** eine Reihe von „Notifiable Diseases“ festgelegt. Das OIE stellt umfangreiche Daten zur Tiergesundheitsituation in Ländern aus aller Welt sowie die ergriffenen Maßnahmen zur Tierseuchenbekämpfung zur Verfügung.

3.1 Anzeigepflichtige Tierseuchen

Die Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2004 (Bundesgesetzblatt I Seite 2764), zuletzt geändert durch Artikel 5 der Verordnung vom 18. Dezember 2009 (Bundesgesetzblatt I Seite 3939) legt die anzeigepflichtigen Tierseuchen in Deutschland fest. In der Tabelle aufgeführt sind die anzeigepflichtigen Tierseuchen, für die weitere nationale oder internationale Rechtsvorschriften bestehen und ein NRL am FLI eingerichtet ist.

Tierseuche	Rechtsgrundlage
Affenpocken	EG-Verordnung für Affenpocken: Nr.1398/2003)
Afrikanische Pferdepest	RL 82/894/EWG; RL 92/35/EWG des Rates vom 29. April 1992 zur Festlegung von Kontrollregeln und Maßnahmen zur Bekämpfung der Pferdepest; Leitlinien zur Pferdepestbekämpfung
Afrikanische Schweinepest	RL 82/894/EWG ; RL 92/119/EWG; RL 2002/60/EG, zuletzt geändert durch RL 2008/73/EG; SchwPestV vom 20.12.2005, zuletzt geändert am 04.10.2010; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Ansteckende Blutarmut der Einhufer	RL 82/894/EWG; VO-Ansteckende Blutarmut der Einhufer (BlutArmV) vom 02.07.1975, zuletzt geändert am 04.10.2010
Ansteckende Schweinelähmung (Teschener Krankheit)	RL 2002/60/EG, zuletzt geändert am 15.07.2008; VO über Sperrbezirke bei Ansteckender Schweinelähmung (SchwKrSpBezV) vom 24.07.1987, zuletzt geändert am 20.12.2005
Aujeszkysche Krankheit	EU Entsch. 93/24 in Verb. mit EU RL 64/432 und 93/244; VO zum Schutz gegen die Aujeszkysche Krankheit (AujeszkKrV) vom 20.12.2005

Tierseuche	Rechtsgrundlage
Beschälseuche der Pferde	RL 82/894/EWG; 93/197/EWG
Blauzungenkrankheit	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG; EU-Verordnung für BTV: Nr. 1266/2007; VO zum Schutz gegen die Blauzungenkrankheit (BlauzungenV) vom 22.03.2002, zuletzt geändert am 06.04.2009
Bovine Herpesvirus Typ 1-Infektion (alle Formen)	EU RL 93/42 in Verb. mit EU RL 95/109; VO zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit BHV1 (BHV1V) vom 20.12.2005
Bovine Virus Diarrhoe	VO zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit BVDV (BVDV) vom 11.12.2008
Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen	RL 2003/99/EG; Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG geändert durch Verordnung (EG) Nr. 535/2002 vom 21. März 2002; VO zum Schutz gegen die Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen (BrucelloseV) vom 20.12.2005
Enzootische Leukose der Rinder	VO zum Schutz gegen die Leukose der Rinder (LeukoseV) vom 13.03.1997, zuletzt geändert am 20.12.2005
Epizootische Hämorrhagie der Hirsche	RL 92/119/EWG
Fischseuchen	RL 82/894/EWG; RL 2006/88/EG; Entscheidung der Kommission 2001/183/EG vom 22. Februar 2001 zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG; Fischseuchenverordnung (FischSeuchV) vom 24. November 2008
Aviäre Influenza	RL 82/894/EWG; EU RL 05/94 und EU Entscheidung 06/437 VO zum Schutz gegen die Geflügelpest (GeflPestSchV) vom 18.10.2007, zuletzt geändert am 18.12.2009
Krebstierkrankheiten	RL 82/894/EWG; RL 2006/88/EG; Fischseuchenverordnung (FischSeuchV) vom 24. November 2008
Lumpy-skin-Krankheit (Dermatitis nodularis)	RL 92/119/EWG
Lungenseuche der Rinder	RL 82/894/EWG
Maul- und Klauenseuche	RL 82/894/EWG; RL 2003/85/EG; VO zum Schutz gegen die Maul- und Klauenseuche (MKSeuchV) vom 20.12.2005; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Milzbrand	VO zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand (MilzBrbV) vom 23.05.1991
Muschelkrankheiten	RL 82/894/EWG; RL 2006/88/EG; Entscheidung der Kommission 2001/183/EG vom 22. Februar 2001 zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG; Fischseuchenverordnung (FischSeuchV) vom 24. November 2008
Newcastle-Krankheit	RL 82/894/EWG; EU RL 92/66; VO Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit (GeflPestV) vom 20.12.2005; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Pest der kleinen Wiederkäuer	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG;
Pferdeenzephalomyelitis (alle Formen)	RL 82/894/EWG;

Tierseuche	Rechtsgrundlage
Pockenseuche der Schafe und Ziegen	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Psittakose (Aviäre Chlamydiose)	RL 2003/99/EG; PsittakoseV vom 20.12.2005
Rauschbrand	VO zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand (MilzbrbV) vom 23.05.1991; in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen
Rifttal-Fieber	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Rinderpest	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Rotz (Malleus)	RL 82/894/EWG; Entscheidung 93/197/EWG der Kommission zur Einfuhr von Equiden Richtlinien zur Feststellung von Rotz vom 07.05.1974, zuletzt geändert am 01.07.1979 VO über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (BmTierSSchV) vom 6.4.2005, zuletzt geändert 11.12.2006
Salmonellose der Rinder	RL 2003/99/EG; VO zum Schutz gegen die Salmonellose der Rinder (RindSalmV) vom 14.11.1991
Schweinepest (klassische)	RL 82/894/EWG; EU RL 2001/89; VO Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest (SchwPestV) vom 20.12.2005, zuletzt geändert am 4.10.2010; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Stomatitis vesicularis	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Tollwut	RL 2003/99/EG; EU-RL 92/65; VO zum Schutz gegen die Tollwut (TollwV) vom 11.04.2001, zuletzt geändert am 17.06.2009; OIE-gelistete Krankheit
Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (alle Formen)	RL 82/894/EWG; EU-VO 999/2001; TSEÜberV vom 13.12.2001, zuletzt geändert am 21.07.2009; TSEVorsorgV vom 20.12.2005; TSEResZV vom 17.10.2005, zuletzt geändert am 31.10.2006; BSEUntersV vom 18.09.2002, zuletzt geändert am 11.12.2008; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Trichomonadenseuche der Rinder	VO zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder (RDeckInfV) vom 3.6.1975 in der Neufassung vom 20.12.2005 vom 20.12.2005
Tuberkulose der Rinder (<i>Mycobacterium bovis</i> und <i>M. caprae</i>)	RL 2003/99/EG; VO zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (RindTbV) vom 13.03.1997, zuletzt geändert am 17.06.2009; Ausführungshinweise zur Verordnung vom 14.04.2010; Zoonosenrichtlinie 92/117/EWG (ABl. EG Nr. L 62/93); Richtlinie BMELV über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen i.d.F.v. 11. November 2009
Vesikuläre Schweinekrankheit	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG; Entsch. 2000/428/EG, Verordnung zum Schutz gegen die Vesikuläre Schweinekrankheit; VSchwKrSchV vom 11.04.2001, zuletzt geändert am 06.07.2007; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Vibrionenseuche der Rinder	VO zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder (RDeckInfV) vom 3.6.1975 in der Neufassung vom 20.12.2005

3.2 Meldepflichtige Tierkrankheiten

Die Verordnung über die meldepflichtigen Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 20. Dezember 2005 (Bundesgesetzblatt I Seite 3516), geändert durch Artikel

2 der Verordnung vom 6. April 2009 (Bundesgesetzblatt I, Seite 752), regelt die Meldepflicht. In der Tabelle aufgeführt sind die meldepflichtigen Tierkrankheiten für die weitere nationale oder internationale Rechtsvorschriften bestehen und ein NRL am FLI eingerichtet ist.

Tierkrankheiten	Rechtsgrundlage
Ansteckende Metritis des Pferdes (CEM)	Entscheidung 93/197/EWG vom 5.2.1993 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen und die Beurkundung für die Einfuhr von registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden
Campylobacteriose (thermophile Campylobacter)	RL 2003/99/EG
Echinokokkose	RL 2003/99/EG
Paratuberkulose	Paratuberkulose-Leitlinien vom 17.01.2005
Toxoplasmose	RL 2003/99/EG (je nach epidemiologischer Situation);
Verotoxinbildende <i>Escherichia coli</i>	RL 2003/99/EG;

3.3 Weitere nationale Referenzlabore am FLI

Zusätzlich zu den NRLs für anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten sind am FLI auch nationale Referenzlabore für einige Tierkrankheiten etabliert, die nur nach Vorgaben der OIE meldepflichtig sind.

Das NRL für „durch Zecken übertragene Krankheiten“ (ZÜK) wurde aufgrund des Erlasses des Bundesministeriums für Gesundheit vom 19.11.1999 auf der Grundlage von Art. 3 in Verbindung mit Art. 4 der Richtlinie 92/117/EWG vom 17.12.1992 eingerichtet.

VI. ORGANISIERTE VERANSTALTUNGEN

Übersicht über Wissenschaftliche Tagungen und Kongresse, die vom FLI oder unter der Beteiligung von FLI-Angehörigen organisiert wurden.

Datum		Titel der Veranstaltung	Verantwortlicher Wissenschaftler
19. - 21.02.2010	Berlin	2nd International Berlin Bat Meeting: Bat Biology and Infectious Diseases	Müller, T.
25.02.2010	Celle	DLG Fachausschuss "Tiergerechtigkeit"	Schrader, L.
11.03.2010	Jena	Wissenschaftliches Fachgespräch zur Problematik „Paratuberkulose“	Menge, C.
11. - 13.03.2010	Hannover	40. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Endoskopie und Bilgebende Verfahren e.V.	Köhler, P.
17. - 18. 03.2010	Hannover	Workshop des Arbeitskreises Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des Respiratorischen Systems (VPPRS) der DVG	Reinhold, P.
22. - 23.03.2010	Hannover	Indikatoren zur Bewertung des nationalen Tierschutzstandard	Schrader, L.
27.04.2010	Celle	Vortragstagung der Gesellschaft der Förderer und Freunde für Geflügel- und Kleintierforschung	Schrader, L.
27. - 28.04.2010	Mariensee	BMELV Workshop „Wohin steuert die Tierzucht im 21. Jahrhundert?“	Niemann, H.
28.04.2010	München	International Meeting on Bovine Besnoitiosis	Schares, G.
01.06.2010	Greifswald	Tagung Vektor-übertragene Infektionskrankheiten, Förderverein des Friedrich-Loeffler-Instituts	Mettenleiter, T.
08.06.2010	Mariensee	Meeting IPSILAM Consortium	Niemann, H.
15. - 16.06.2010	Berlin	Workshop Neglected Diseases (Zoonoseplattform)	Groschup, M.
22. - 24.06.2010	Jena	Tagung der Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie" der DVG	Neubauer, H.
07. - 08.10.2010	Berlin	National Symposium on Zoonoses Research 2010	Groschup, M. Wiet-hölder, A.
10.10.2010	Greifswald	100 Jahre Forschung für die Tiergesundheit – 100 Jahre Friedrich-Loeffler-Institut	Mettenleiter, T.
11. - 13.10.2010	Greifswald	Animal Health in the 21st Century	Mettenleiter, T.
13. - 14.10.2010	Insel Riems	CWA 15793 – Umsetzung des Laboratory Biorisk Management Standard	Teifke, Jens.
18. - 20.10.2010	Greifswald	GOHLD-Group Meeting	Groschup, M.
30.10.2010	Mariensee	Tag der offenen Tür im Rahmen der Wissenschaft „Hannover will's wissen“	Niemann, H.
03. - 04.11.2010	Jena	27. Jenaer Symposium: Horses – Orphan infectious diseases	Melzer, Falk.
15.11.2010	Santiago de Chile	World Buiatrics Conference; Symposium Tissue-cyst forming protozoa: <i>Neospora caninum</i> and <i>Besnoitia besnoiti</i>	Conraths, F.J.
30.11.2010	Jena	Wissenschaftliches Seminar der DVG-Fachgruppe Bakteriologie/ Mykologie und des Friedrich-Loeffler-Instituts	Neubauer, H.

Datum		Titel der Veranstaltung	Verantwortlicher Wissenschaftler
01. - 02.12.2010	Palermo/ Sizilien	EFABISnet Final Conference	Groeneveld, E.
07. - 08.12.2010	Mariensee	Workshop "Induzierte Pluripotente Stammzellen (iPSC)"	Niemann, H.
in 2010	Greifswald	100 Jahre Forschung für Tiergesundheit - 100 Jahre Friedrich-Loeffler-Institut (Vortragsreihe mit 5 Veranstaltungen)	Reinking, E.
in 2010	Mariensee	Marienseer Gespräche (Vortragsreihe mit 8 Veranstaltungen)	Niemann, H.

Übersicht über Weiterbildungsveranstaltungen, die vom FLI oder unter der Beteiligung von FLI-Angehörigen organisiert wurden:

Datum		Titel der Veranstaltung	Verantwortlicher Wissenschaftler
24. - 26.08.2010	Wusterhausen	3. Bundesweite Expertenschulung im Rahmen der Bund-Länder-Vereinbarung Task force Tierseuchenbekämpfung	Kramer, M
21. - 22.09.2010	Jena	Laborworkshop Diagnostik <i>Bacillus anthracis</i>	Elschner, M.
29.09 - 01.10.2010	Wusterhausen	Epidemiological tools to support veterinary authorities and risk managers in controlling animal disease epidemics	Staubach, C.
04. - 06.10.2010	Berlin	Doktorandenworkshop 2010 "Presenting Science"	Wiethölter, A.
21.10.2010	Zollikhofen/ Schweiz	International Cryoweb Workshop (EFABISnet)	Groeneveld, E.
02. - 03.11.2010	Wusterhausen	Tierseuchennachrichtensystem (TSN) Workshop	Klöß, K.
03. - 04.11.2010	Wusterhausen	Trade Control and Export System (TRACES) Workshop	Micklich, A.

VII. PRESSE- UND ÖFFENTLICHKEITSARBEIT

Als Ansprechpartner der Medien war das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI), im Jahr 2010 zu verschiedensten Themen rund um die Tiergesundheit gefragt. Von tagesaktuellen Themen wie dem Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden zum Jahresbeginn über die Auswirkungen des Klimawandels in der Landwirtschaft, dem Ebergeruch von Fleisch sowie dem Thema „Klontiere“ und die Vermarktung von Produkten ihrer Nachkommen bis zu „10 Jahre BSE in Deutschland“ reichten die Anfragen. Daraus resultierten Beiträge in Zeitungen, Magazinen, online-Medien, Radio- und Fernsehsendungen.

Ebenso vielfältig waren die Fragen aus der Bevölkerung, die mit Unterstützung der Wissenschaftler aller Fachinstitute des FLI beantwortet wurden.

Die Vorbereitungen zum 100-jährigen Gründungsjubiläum des FLI nahmen einen Großteil der Presse- und Öffentlichkeitsarbeit ein. Zum Jubiläum gab das FLI mit Hilfe externer Autoren zwei Publikationen heraus, das Buch „Das Friedrich-Loeffler-Institut 1910 – 2010, 100 Jahre Forschung für die Tiergesundheit“ von Annette Hinz-Wessels und Jens Thiel sowie die Broschüre „Die Kunst auf der Insel Riems“ von Detlef Witt unter Mitarbeit von Barbara Riebe, Insel Riems. Im eigens dafür renovierten Loeffler-Haus, dem ältesten Institutsgebäude, entstand eine Ausstellung zur Institutsgeschichte mit Exponaten aus der Forschungsarbeit und zur Person Friedrich Loefflers.

Im Vorfeld des Jubiläums bot das FLI zusammen mit der Universitäts- und Hansestadt Greifswald, dem Stadtarchiv und der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald abwechslungsreiche Einblicke in die Geschichte und Arbeit des Instituts sowie das Wirken seines Gründers in Greifswald. Hierzu gehörten eine Vortragsreihe an der Universität und die Ausstellung „Friedrich Loeffler (1852-1915) – herausragender Wissenschaftler und Greifswalder Ehrenbürger“ im Rathauskeller in Greifswald. Gemeinsam organisierte Pressegespräche und eine Journalistenreise trugen zur umfangreichen Information der Medien bei. So wurde bereits im Vorfeld sowohl lokal, regional als auch überregional über das Jubiläum, vor allem im Zusammenhang mit der Einweihung der Neubauten am Hauptstandort Insel Riems, berichtet.

Bereits ab Herbst 2009 betreute das FLI zusammen mit der Universität und der Stadt Greifswald das Schulprojekt „100 Jahre Friedrich-Loeffler-Institut“, in dem Schüler eine eigene Internetseite zum Leben und Wirken Loefflers erstellten. Am 7. Oktober gab das Bundesministerium der Finanzen das Sonderpostwertzeichen „100 Jahre Friedrich-Loeffler-Institut“ heraus. Die Sonderbriefmarke mit einem Wert von 85 Cent zeigt den Institutsgründer Friedrich Loeffler, Influenzaviren, Petrischalen sowie ein Mikroskop und wurde vom Grafiker Kym Erdmann aus Kiel gestaltet. Bundeslandwirtschaftsministerin Ilse Aigner nahm die Sonderbriefmarke gemeinsam mit dem Präsidenten des FLI, Prof. Dr. Dr. h. c.

Thomas C. Mettenleiter, am Rande der Agrarministerkonferenz in Lübeck entgegen.

Zum Jubiläumstag am 10. Oktober 2010 veranstaltete das FLI am Hauptstandort Insel Riems erstmals einen „Tag der offenen Tür“. Über 8200 Besucher hatten bei strahlendem Sonnenschein die Gelegenheit, einen Blick hinter die Kulissen des Instituts zu werfen. Alle Angebote vom Geschichtsvortrag über die Präsentationen der Fachinstitute bis zu den Besichtigungen von Teilen des Neubaus und die neue Ausstellung im Loeffler-Haus fanden im wahrsten Sinne des Wortes regen Andrang. Am Abend klang der Jubiläumstag mit einem Festakt mit 300 geladenen Gästen in der Stadthalle Greifswald aus.

Den wissenschaftlichen Abschluss der Feierlichkeiten zum 100-jährigen Jubiläum des FLI bildete die internationale Tagung „Animal Health in the 21st Century“ vom 11. bis 13. Oktober in Greifswald.

Nachfolgend ein kleiner Überblick der Medienthemen des vergangenen Jahres.

Aus dem Terminkalender 2009

15.–16. April

Klausurtagung der Staatssekretäre der für die Lebensmittelsicherheit und die Tiergesundheit zuständigen Ministerien am FLI Insel Riems

22. April

Girls' Day und Zukunftstag an den FLI-Standorten Celle, Mariensee, Insel Riems und Wusterhausen

8. Juni

Präsentation des Schulprojektes „100 Jahre Friedrich-Loeffler-Institut“ im Rahmen der Projektinitiative des Vereins „Fit für die Wirtschaft“ in Greifswald

7. Oktober

Übergabe des Sonderpostwertzeichens „100 Jahre Friedrich-Loeffler-Institut“ durch das Bundesministerium der Finanzen

10. Oktober

Tag der offenen Tür am Hauptstandort Insel Riems zum 100-jährigen Gründungsjubiläum

30. Oktober

„Tierzuchtforshung heute“ Veranstaltung des Instituts für Nutztiergenetik am Standort Mariensee im Rahmen des „November der Wissenschaft 2010“ der Initiative Wissenschaft Hannover

Aus dem Medienkalender

12. Januar

Fernsehbeitrag zur Aufruffütterung von Sauen „Das Schwein“, Interviews mit Jasmin Kirchner und Dr. Lars Schrader, Leiter des Instituts für Tierschutz und Tierhaltung des FLI in Celle, in der RTL- Sendung „Spiegel-TV“

29. Januar

Interview zum Thema „Q-Fieber in den Niederlanden – aktuelle Situation in Deutschland“ mit Dr. Klaus Henning, Leiter des Referenzlabors für Q-Fieber am FLI Wusterhausen, in der Radiosendung „Logo“ von NDR-Info

9. Mai

Fernsehbeitrag zur Aufruffütterung von Sauen „Die Schweineflüsterer“, Interviews mit Jasmin Kirchner und Dr. Lars Schrader, Leiter des Instituts für Tierschutz und Tierhaltung des FLI in Celle, in der ARD-Sendung „W wie Wissen“

6. August

Radiointerview zum Thema „Klonfleisch auch bei uns?“ mit Prof. Dr. Heiner Niemann, Leiter des Instituts für Nutztiergenetik des FLI in Mariensee, bei SWR cont.ra – Ernährung und Umwelt

11. August

Fernsehbeitrag „Bio – die bessere Lösung?“, Interview mit Dr. Lars Schrader, Leiter des Instituts für Tierschutz und Tierhaltung des FLI in Celle in der ZDF-Sendung „Abenteuer Wissen“

19. August

Fernsehinterview zum Thema „Achtung Zecken!“ mit Dr. Jochen Süss, Leiter des Referenzlabors für durch Zecken übertragene Krankheiten des FLI in Jena, in der MDR-Sendung „Hauptsache gesund“

3. September

Fernsehbeitrag zum Neubau und 100-jährigen Gründungsjubiläum am Hauptstandort Insel im NDR-Nordmagazin

7. Oktober

Fernsehbeitrag zur Sonderbriefmarke „100 Jahre Friedrich-Loeffler-institut“ in der ARD-Sendung „Büffet“

10. Oktober

Fernsehbeiträge zum 100-jährigen Gründungsjubiläum und Tag der offenen Tür in den Sendungen NDR-Nordmagazin und ZDF-Heute Journal

14. Oktober

Fernsehbeitrag „Herr der Viren“ mit einem Portrait über Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas C. Mettenleiter und das FLI in der Reihe „Typisch norddeutsch“ des NDR

25. November

Fernsehbeitrag zum Jubiläum des FLI in der MDR-Sendung „artour“

VIII. KOOPERATIONEN MIT HOCHSCHULEN UND MITARBEIT IN WISSENSCHAFTLICHEN GREMIEN

1. VORLESUNGS- UND HOCHSCHULTÄTIGKEITEN:

Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des FLI arbeiten mit nationalen und internationalen Universitäten in der Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses und der Weiterbildung von Veterinären und wissenschaftlichem Personal zusammen.

In 2009 wurden Prof. Timm Harder (IVD) an der Universität Kiel, Prof. Christian Menge (IMP) an der Justus-Liebig-Universität Gießen und Prof. Heiner Neubauer (IBIZ) an der Universität Leipzig zum außerplanmäßigen Professor ernannt.

Lehraufträge und Ausbildungskooperationen bestehen zu folgenden Einrichtungen:

Universität/Hochschule	Wissenschaftlerin/Wissenschaftler
Christian-Albrechts-Universität, Kiel	Prof. Dr. T. Harder (IVD) Prof. Dr. H. Niemann (ING) Prof. Dr. D. Rath (ING)
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen	PD Dr. R. Kammerer (IfI) PD Dr. M. Knittler (IfI) Dr. C. Luttermann (IfI) Prof. Dr. G. Meyers (IfI) Dr. B. Petsch (IfI) Dr. H.J. Rziha (IfI) Prof. Dr. L. Stitz (IfI)
Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald	PD Dr. S. Finke (IMB) Dr. habil. H. Granzow (IMED) Prof. Dr. Dr. h.c. T.C. Mettenleiter (IMB) Dr. J. Stech (IMB) PD Dr. R.G. Ulrich (INNT)
Fachhochschule Südwestfalen, Soest	Prof. Dr. H. Niemann (ING) Prof. Dr. D. Rath (ING)
Freie Universität Berlin	PD Dr. F. Conraths (IfE) Dr. C. Freuling (IfE) Dr. A. Fröhlich (IfE) Dr. J.M. Gethmann (IfE) Dr. D.W. Höreth-Böntgen (IfE) Dr. U. Methner (IBIZ) PD Dr. Dr. P. Reinhold (IMP) Dr. C. Schoene (IfE) Dr. C. Seyboldt (IBIZ) Dr. C. Staubach (IfE) PD Dr. Dr. T.W. Vahlenkamp (IMED)
Friedrich-Schiller-Universität, Jena	PD Dr. J. Süß (IBIZ) PD Dr. H. Tomaso (IBIZ)
Georg-August Universität, Göttingen	PD Dr. I. Halle (ITE) Dr. J. Kjaer (ITT)
Justus-Liebig-Universität, Gießen	Prof. Dr. C. Menge (IMP) Prof. Dr. S. Schwarz (ING) Prof. Dr. L. Stitz (IfI) Prof. Dr. J.P. Teifke (ATB)

Universität/Hochschule	Wissenschaftlerin/Wissenschaftler
Leibniz Universität Hannover	Prof. Dr. N. Parvizi (ING)
Ludwig-Maximilians-Universität, München	PD Dr. M. Beer (IVD) PD Dr. C. Grund (IVD) PD Dr. R. Kammerer (IfI)
Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg	Prof. Dr. Dr. S. Dänicke (ITE) PD Dr. I. Halle (ITE)
Medizinische Hochschule Hannover	Prof. Dr. H. Niemann (ING)
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn	PD Dr. H. Kampen (IMED) Prof. Dr. T. Selhorst (IfE)
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover	Dr. A. Balkema-Buschmann (INNT) Dr. J. Berk (ITT) D. C. Fast (INNT) Dr. A. Fröhlich (IfE) Dr. J.M. Gethmann (IfE) Prof. Dr. M.H. Groschup (INNT) Dr. K. Kadlec (ING) Dr. M. Kramer (IfE) Dr. W.A. Kues (ING) Prof. Dr. E. Liebler-Tenorio (IMP) Dr. M. Marahrens (ITT) Prof. Dr. H. Niemann (ING) Prof. Dr. N. Parvizi (ING) Prof. Dr. D. Rath (ING) Dr. L. Schrader (ITT) Prof. Dr. S. Schwarz (ING)
Universität Hohenheim, Stuttgart	PD Dr. A. Aschfalk (IfE)
Universität Leipzig	PD Dr. A. Berndt (IMP) Dr. C. Klaus (IBIZ) Prof. Dr. H. Neubauer (IBIZ)
Universität Rostock	Dr. S.M. Bergmann (IMED) Dr. U. Fischer (IMED)
Universität zu Köln	PD Dr. M. Knittler (IfI)

2. WISSENSCHAFTLICHE GREMIEN

Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des FLI arbeiten aktiv in wissenschaftlichen Gremien nationaler und internationaler Organisationen mit.

2.1 GREMIEN INTERNATIONALER ORGANISATIONEN

Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE):

Prof. Mettenleiter ist gewähltes Mitglied des Scientific Commission for Animal Diseases

Expertengruppen "confirmatory TSE tests" (Prof. Groschup, INNT) und "OFFLU Technical group" (Prof. Harder, IVD)

Europäische Kommission

DG-SANCO:

Food and Veterinary Office – FVO (Dr. Kramer, IfE; Dr. Marahrens, ITT)

Veterinary Emergency Team (Dr. Böhle, AG-ITG; Dr. Depner, AG-ITG; Dr. Globig, AG-ITG; Dr. Höreth-Böntgen, IfE; Dr. Kramer, IfE)

Task force "Animal Disease surveillance" (Dr. Kramer, IfE; Dr. Müller, IfE)

Task Force "Monitoring Animal Disease Eradication" (Dr. Kramer, IfE)

Steering working group „Categorization of Animal Disease Risks" (Dr. Kramer, IfE)

TRACES Working Group (Dr. Micklich, IfE)

KS 07 IB AG 01 "Meeting EU Standards on Food Safety and Veterinary Service (Dr. Kramer, IfE)

"Strain typing Expert Group" des TSE-Gemeinschaftsreferenzlabors (Prof. Groschup, INNT)

DG Justice: CBRN TF Bio-Subgroup (Prof. Neubauer, IBIZ)

EU-COST Programm: Domain Food and Agriculture (Dr. Sachse, IMP)

Weltgesundheitsorganisation (WHO)

Expert Committee for Rabies (Dr. Müller, IfE);

Arbeitsgruppe "tick-borne encephalomyelitis – TBE" (PD Dr. Süss, IBIZ)

Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO)

Global Feed Initiative (Prof. Flachowsky, ITE)

"Research Group of the Standing Technical Committee for the Control of Foot-and-Mouth Disease – EUFMD (Dr. Haas, IVD)

Arbeitsgruppe für Tiergenetische Diversitätsbewertung (FAO/ISAG International Society for Animal Genetics), (Dr. Weigend, ING)

EFSA – European Food Safety Authority

EFSA-Gremien: "Genetically Modified Organisms" – GMO-Panel (Prof. Flachowsky, ITE);

"Additives and products or substances used in animal feed" – FEEDAP-Panel (PD Dr. Halle, ITE); Advisory Board des Animal Health and Animal Welfare – AHAW-Panel (PD Dr. Conraths, IfE)

EFSA-Arbeitsgruppen:

"Guidance on human health risk assessment of GM animals" und "Safety assessment of foods derived from recombinant-DNA animals" (Prof. Niemann, ING);

"BSE related risk in bovine intestines" (Dr. Fast, INNT);

"BSE/TSE Infectivity in small ruminant tissues" (Dr. Fast, INNT);

"Evaluation TSE test" (Dr. Balkema-Buschmann, INNT);

BSE Netzwerk (Prof. Groschup, Dr. Balkema-Buschmann; INNT);

"National TSE Focal point" (Prof. Groschup, INNT);

"ECDC/EFSA joint working group on zoonotic risks of TSEs" (Prof. Groschup, INNT)

„African Swine Fever" (Dr. Blome, IVD)

„Brucellosis in pigs" (Dr. Melzer, Prof. Neubauer, IBIZ)

„Q-Fever in Europe" (Prof. Neubauer, IBIZ)

2.2 GREMIEN UND KOMMISSIONEN AUF BUNDES- ODER LÄNDEREBENE:

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV)

Dr. Weigend (ING) ist Mitglied des Beirats für Biodiversität und genetische Ressourcen

Prof. Groeneveld (ING) ist Berater der Tierzuchtreferenten des Bundes und der Länder in züchterischen Fragen

Weitere Arbeitsgruppen:

§ 64 LFGB-AG „Molekularbiologische Methoden Mikrobiologie" (Dr. Hotzel, IBIZ) und „Viren" (Dr. Otto, IBIZ)

AG Länderreferenten Eier und Geflügel, Mast des BMELV (Dr. Berk, ITT)

AG „Carry over unerwünschter Stoffe" (Prof. Dänicke, ITE)

AG Landwirtschaft (Dr. Lange, IMED)

Sachverständigenengruppe zur Erarbeitung von "Bundeseinheitlichen Leitlinien für die gute betriebliche Praxis zur Haltung von Masthühnern (Dr. Berk, ITT)

Überarbeitung der „Bundeseinheitlichen Eckwerte für eine freiwillige Vereinbarung zur Haltung von Mast-

puten (Dr. Berk, ITT)

Senat der Bundesforschungsinstitute des BMELV

Prof. Mettenleiter war Präsident des Senats (bis Nov. 2010) und ist zusammen mit Dr. Schrader (ITT) Mitglied des Senats.

Senatsarbeitsgruppen „Klimaanpassung“ (Dr. Köhler, ING), „Biodiversität“ (Dr. Henning, ING), „Ökologischer Landbau“ (Dr. J. Berk, ITT; Dr. A. Berk, ITE), „Mykotoxine“ (Prof. Dänicke, ITE), „Ökobilanzierung“ (Dr. Meyer, ITE) und „Synthetische Nanomaterialien“ (Dr. Döll, ITE)

Bioökonomierat – Beratungsgremium der Bundesregierung zur Bioökonomie

(Prof. Mettenleiter, IMB)

Verbraucherschutzministerkonferenz (LAV):

Arbeitsgruppe Tierschutz (AGT) (Dr. Marahrens, ITT)

Länderarbeitsgemeinschaft gesundheitlicher Verbraucherschutz (LAGV):

Arbeitsgruppe „Kontrolle Nutztierhaltungen“ (Dr. Marahrens, ITT)

Task-Force Tierseuchenbekämpfung – Bund/Länder Arbeitsgruppe:

Expertengruppe und Tierseuchenbekämpfungshandbuch –TSBH (Dr. Blome, IVD; Prof. Groschup, INNT; Dr. Haas, IVD; Dr. Kramer, IfE)

Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei in Mecklenburg-Vorpommern:

Fachbeirat „Schaf- und Ziegenzucht Mecklenburg-Vorpommern“ (Dr. Schirrmeier, IVD), Fachbeirat für Rinderzucht (PD Dr. Beer, IVD)

Rat für Agrarwissenschaften in Mecklenburg-Vorpommern:

(PD Dr. Beer, IVD)

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit – LAVES:

Sachverständigengruppe „Weiterentwicklung der Niedersächsischen Putenvereinbarung“ (Dr. Berk, ITT)

Ministerium für Landwirtschaft und Umwelt des Landes Sachsen-Anhalt:

Sachverständigengruppe „Putenvereinbarung“ (Dr. Berk, ITT)

Bundesministerium für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung (BMBVS):

Arbeitsgruppe „Klasse 6.2“ (Infektiöses Gefahrgut) im Ausschuss Gefahrgutbeförderung (AGGB) im Gefahrgut-Verkehrs-Beirat (Dr. Haas, IVD)

Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS):

Arbeitskreis Beschluss 603 (Balkema-Buschmann, INNT), Arbeitskreis TRBA 120 „Versuchstierhaltung“ im Unterausschuss 2 „Schutzmaßnahmen“ (Dr. Haas, IVD)

Tierschutzkommission nach § 15 Tierschutzgesetz (TSchG)

Bundesland Mecklenburg-Vorpommern (Dr. Fischer; IMED), Bundesland Brandenburg (Dr. Geue; IfE); Regierungspräsidium Tübingen (Prof. Stitz, Prof. Kammerer; IfI); Thüringer Ministerium für Soziales und Gesundheit (Dr. Köhler, Dr. Heller; IMP), Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (Dr. Henning, Dr. Baulain; ING)

2.3 GREMIEN UND KOMMISSIONEN AN NATIONALEN UND INTERNATIONALEN FORSCHUNGSEINRICHTUNGEN:

Wissenschaftliche Beiräte (Scientific Advisory Board) von Forschungseinrichtungen:

Bundesinstitut für Risikobewertung (Prof. Flachowsky, ITE); Forschungsinstitut für Futtermitteltechnik Braunschweig-Thune (Prof. Dänicke, ITE); Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (Prof. Dänicke, ITE); Paul-Ehrlich-Institut (Prof. Mettenleiter); Zentrum für Veterinary Public Health der Universität Leipzig (Prof. Mettenleiter) Britisches Verbraucherschutzministerium (DEFRA): Research Advisory Group (RAG) und Review of the TSE molecular sciences programme (VLA Weybridge), (Prof. Groschup, INNT); Institute for Animal Health, Pirbright: Scientific Advisory Board (Prof. Mettenleiter); PrioNet Canada: Advisory Board (Prof. Groschup, INNT)

Kommissionen an nationalen Einrichtungen:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE): Projektbeirat „Biopatente in der Tierzucht“ (Dr. Baulain, ING) Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): „Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel“ (Prof. Niemann, ING); „GMO“ (Prof. Flachowsky, ITE); „Kontaminanten und andere gesundheitlich relevante Stoffe in der Lebensmittelkette“ (Prof. Dänicke, ITE); für Biologische Gefahren (Prof. Neubauer, IBIZ); für Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe in der Tierernährung (PD Dr. Halle, ITE); für Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe in der Tierernährung (Dr. Meyer, ITE) Paul-Ehrlich-Institut (PEI): Arbeitsgruppe „Gesamtstrategie Blutversorgung angesichts vCJK“ (Dr. Balkema-Buschmann, INNT) Robert Koch-Institut (RKI): „Kommission zur Evaluierung der Nationalen Referenzzentren“ (Prof. Groschup, INNT)

Kommissionen an internationalen Einrichtungen:

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI):
Subcommittee "Veterinary Antimicrobial Susceptibility
Testing" und verschiedene Arbeitsgruppen (Prof.
Schwarz, ING)

Danish Council for Strategic Research: Peer Review
College (Dr. Fischer, IMED)

International Committee of Systematic Bacteriology
(ICSB): Subcommittees on the Taxonomy of Chlamydiales
and Mollicutes (Dr. Sachse, IMP)

Wehrwissenschaftlicher Ausschuss des Verteidigungs-
ministers der Republik Österreich (Prof. Neubauer, IBIZ)

2.4 MITGLIEDSCHAFTEN IN WISSENSCHAFTLICHEN AKADEMIEN:

Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina -
Nationale Akademie der Wissenschaften (Prof. Metten-
leiter, Prof. Niemann)

Akademie der Wissenschaften in Hamburg (Prof.
Mettenleiter)

Polnische Akademie der Wissenschaften (Prof. Metten-
leiter)

Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt (PD
Dr. Süß, PD Dr. Reinhold)

Österreichische Akademie der Wissenschaften (PD Dr.
Reinhold)

IX. PUBLIKATIONEN

Die Kommunikation von Informationen und Forschungsergebnissen sind ein wichtiger Bestandteil der Arbeiten des FLI. Über verschiedene Publikationswege werden die unterschiedlichen Zielgruppen angesprochen, wobei als Bundesforschungsinstitut der Austausch mit der wissenschaftlichen Gemeinschaft im Vordergrund steht. Neben den hier aufgeführten Publikationen werden Forschungsergebnisse des FLI in Vorträgen und Posterpräsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen und Fachtagungen vorgestellt, deren Zusammenfassungen teilweise auch Proceedings veröffentlicht werden, hier aber nicht einzeln aufgelistet werden.

1. VERÖFFENTLICHUNGEN DES FLI

Jahresbericht 2009 / Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit. Greifswald-Insel Riems. 2009. 212 S. ISSN 1861-0005. www.fli.bund.de

Tiergesundheitsjahresbericht 2009 / Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit. Greifswald-Insel Riems und Wusterhausen. 10. Jahrgang 2010. 129 S. ISSN 1867-9374. www.fli.bund.de

Rabies Bulletin Europe / Hrsg.: Freuling, C. und T. Müller. Vol. 33, No. 3 und 4 (2009); Vol. 34, No. 1, 2 und 3 (2010). ISSN 0257-8506. www.who-rabies-bulletin.org

Der Loeffler / Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald-Insel Riems, 4. Jahrgang 2010; Heft Nr. 7 und 8. ISSN 1868-1417.

Der LabLoeffler / Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald-Insel Riems, 3. Jahrgang 2010; Heft 3. ISSN 2190-7153.

Hinz-Wessels, A. und J. Thiel. Das Friedrich-Loeffler-Institut 1910-2010, 100 Jahre Forschung für die Tiergesundheit. Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems. be.bra wissenschaft verlag, Berlin (2010). 271 S. ISBN 978-3-937233-69-7.

Hinz-Wessels, A. und J. Thiel. The Friedrich-Loeffler-Institute 1910-2010, 100 Years of Research for Animal Health. Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems. be.bra wissenschaft verlag, Berlin (2010). 272 S. ISBN 978-3-937233-75-8.

Witt, D. (unter Mitarbeit von B. Riebe). Die Kunst auf der Insel Riems. Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut Insel Riems,

Greifswald-Insel Riems (2010). 120 S. ISBN 978-3-00-032416-1.

„Wiege der Virusforschung“ – Eine Ausstellung zur 100-jährigen Geschichte des Friedrich-Loeffler-Instituts. Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald-Insel Riems (2010). 23 S.

2. WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

2.1 WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN (PEER-REVIEWED)

ABDELWHAB, E.-S.M., A.M. ERFAN, C. GRUND, M. ZILLER, A.-S. ARAFA, M. BEER, M.M. ALY, H.M. HAFEZ, AND T.C. HARDER. 2010. Simultaneous detection and differentiation by multiplex real-time RT-PCR of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 classic (clade 2.2.1 proper) and escape mutant (clade 2.2.1 variant) lineages in Egypt. *Virology J* **7**:260.

AGUADO-MARTÍNEZ, A., G. ÁLVAREZ-GARCÍA, G. SCHARES, V. RISCO-CASTILLO, A. FERNÁNDEZ-GARCÍA, V. MARUGÁN-HERNÁNDEZ, AND L.M. ORTEGA-MORA. 2010. Characterisation of NcGRA7 and NcSAG4 proteins: Immunolocalisation and their role in the host cell invasion by *Neospora caninum* tachyzoites. *Acta Parasitol* **55**:304-312.

AL DAHOUK, S., H.C. SCHOLZ, H. TOMASO, P. BAHN, C. GÖLLNER, W. KARGES, B. APPEL, A. HENSEL, H. NEUBAUER, AND K. NÖCKLER. 2010. Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiol* **10**:269.

BACKOVIC, M., R.M. DuBOIS, J.J. COCKBURN, A.J. SHARFF, M.-C. VANEY, H. GRANZOW, B.G. KLUPP, G. BRICOGNE, T.C. METTENLEITER, AND F.A. REY. 2010. Structure of a core fragment of glycoprotein H from pseudorabies virus in complex with antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:22635-22640.

BACKOVIC, M., D.X. JOHANSSON, B.G. KLUPP, T.C. METTENLEITER, M.A.A. PERSSON, AND F.A. REY. 2010. Efficient method for production of high yields of Fab fragments in *Drosophila* S2 cells. *Protein Eng Des Select* **23**:169-174.

BADER, S.R., S. KOTHLow, S. TRAPP, S.C.N. SCHWARZ, H.-C. PHILIPP, S. WEIGEND, A.R. SHARIFI, R. PREISINGER, W. SCHMAHL, B. KASPERS, AND K. MATIASEK. 2010. Acute parietic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute

- inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans. *J Neuroinflammation* **7**:7.
- BAECHLEIN, C., A. SCHIELKE, R. JOHNE, R.G. ULRICH, W. BAUMGAERTNER, AND B. GRUMMER. 2010. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbiol* **144**:187-191.
- BANDINI, L.A., A.F.A. NETO, H.F.J. PENNA, G.T. CAVALCANTE, G. SCHARLES, S.M. NISHI, AND S.M. GENNARI. 2010. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.047]
- BASSO, W., S. SCHARLES, L. MINKE, A. BÄRWALD, A. MAKSIMOV, M. PETERS, C. SCHULZE, M. MÜLLER, F.J. CONRATHS, AND G. SCHARLES. 2010. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol* **173**:24-31.
- BEER, M. 2010. Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) – Ätiologie, Epidemiologie, Pathogenese, Klinik und Immunologie. *Prakt Tierarzt* **91** (Suppl. 5):3-9.
- BEER, M. 2010. Diagnostik und Impfung bei Bovinem Herpesvirus Typ 1 (BHV-1). *Prakt Tierarzt* **91** (Suppl 5): 10-15.
- BEER, M. 2010. Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) – Status und gesetzliche Regelungen, Bekämpfungsstrategien und Problemlösungen. *Prakt Tierarzt* **91** (Suppl. 5):16-20.
- BERGER-SCHOCH, A.E., D.C. HERRMANN, G. SCHARLES, N. MÜLLER, D. BERNET, B. GOTTSTEIN, AND C.F. FREY. 2010. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. *Vet Parasitol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.046]
- BERGMANN, S.M., M. RIECHARDT, D. FICHTNER, P. LEE, AND J. KEMPTER. 2010. Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. *J Virol Meth* **163**:229-233.
- BERGMANN, S.M., J. SADOWSKI, M. KIELPINSKI, M. BARTLOMIEJCZYK, D. FICHTNER, R. RIEBE, M. LENK, AND J. KEMPTER. 2010. Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). *J Fish Dis* **33**:267-272.
- BERGMANN, S.M., P. LUTZE, H. SCHÜTZE, U. FISCHER, M. DAUBER, D. FICHTNER, AND J. KEMPTER. 2010. Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD). *Bull Eur Ass Fish Pathol* **30**:74-84.
- BERMEJO-ALVAREZ, P., P. LONERGAN, D. RATH, A. GUTIERREZ-ADAN, AND D. RIZOS. 2010. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced *in vitro* with sex-sorted sperm. *Reprod Fertil Dev* **22**:426-436.
- BERMEJO-ALVAREZ, P., D. RIZOS, D. RATH, P. LONERGAN, AND A. GUTIERREZ-ADAN. 2010. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **107**:3394-3399.
- BERNDT, A., R. KÖLLNER, P. RICHTER, M. FRANZ, A. VOIGT, A. BERNDT, L. BORSI, R. GIAVAZZI, D. NERI, AND H. KOSMEHL. 2010. A comparative analysis of oncofetal fibronectin and tenascin-C incorporation in tumour vessels using human recombinant SIP format antibodies. *Histochem Cell Biol* **133**:467-475.
- BEYER, M., S. DÄNICKE, D. ROHWEDER, AND H.-U. HUMPF. 2010. Determination of deoxynivalenol-sulfonate (DONs) in cereals by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Mycotox Res* **26**:109-117.
- BINTINTAN, I. AND G. MEYERS. 2010. A New Type of Signal Peptidase Cleavage Site Identified in an RNA Virus Polyprotein. *J Biol Chem* **285**:8572-8584.
- BLOME, S., I. GROTHA, V. MOENNIG, AND I. GREISER-WILKE. 2010. Classical swine fever virus in South-Eastern Europe – Retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology. *Vet Microbiol* **146**:276-284.
- BOGS, J., J. VEITS, S. GOHRBANDT, J. HUNDT, O. STECH, A. BREITHAUP, J.P. TEIFKE, T.C. METTENLEITER, AND J. STECH. 2010. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses Carry Virulence Determinants beyond the Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site. *PLoS ONE* **5**:e11826.
- BOGUHN, J., D. NEUMANN, A. HELM, E. STROBEL, C.C. TEBBE, S. DÄNICKE, AND M. RODEHUTSCORD. 2010. Effects of concentrate proportion in the diet with or without *fusarium* toxin-contaminated triticale on ruminal fermentation and the structural diversity of rumen microbial communities *in vitro*. *Arch Anim Nutr* **64**:467-483.
- BOLLWEIN, H., D. PROST, S.E. ULBRICH, H. NIEMANN, AND A. HONNENS. 2010. Effects of a shortened preovulatory follicular phase on genital blood flow and endometrial hormone receptor concentrations in Holstein-Friesian cows. *Theorigenology* **73**:242-249.
- BORTH, N., J. MASSIER, C. FRANKE, K. SACHSE, H.-P. SALUZ, AND F. HÄNEL. 2010. Chlamydial protease CT441 interacts with SRAP1 co-activator of estrogen receptor α and partially alleviates its co-activation activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* **119**:89-95.
- BOURQUIN, C., P. VON DER BORCH, C. ZOGLMEIER, D. ANZ, N. SANDHOLZER, N. SUHARTHA, C. WURZENBERGER, A. DENZEL, R. KAMMERER, W. ZIMMERMANN, AND S. ENDRES. 2010. Efficient Eradication of Subcutaneous but Not of Autochthonous Gastric Tumors by Adoptive T Cell Transfer in an SV40 T Antigen Mouse Model. *J Immunol* **285**:2580-2588.
- BRANDT, H., D.N. WERNER, U. BAULAIN, W. BRADE, AND F. WEISSMANN. 2010. Genotype-environment interactions for growth and carcass traits in different pig breeds kept under conventional and organic production systems. *Animal* **4**:535-544.
- BRIDGER, P.S., M. MOHR, I. STAMM, J. FRÖHLICH, W. FÖLLMANN, S. BIRKNER, H. METCALFE, D. WERLING, G. BALJER, AND C. MENGE. 2010. Primary bovine colonic cells: A model to study strain-specific responses to *Escherichia coli*. *Vet Immunol Immunopathol* **137**:54-63.

- CASPARI, D.K., A. BALKEMA-BUSCHMANN, H.R. BRANDT, M.H. GROSCHUP, G. ERHARDT, AND G. LÜHKEN. 2010. Polymorphisms in genes CTSB, CTSD, CAPN2, KLK1 and TGFB1 not associated with susceptibility to atypical or classical ovine scrapie. *Arch Tierz* **53**:457-464.
- CHRENEK, P., R. GROSSMANN, AND A.V. SIROTKIN. 2010. The cAMP analogue, dbcAMP affects release of steroid hormones by cultured rabbit ovarian cells and their response to FSH, IGF-I and ghrelin. *Eur J Pharmacol* **640**:202-205.
- COHEN, S., E.J.H. MULDER, H.A. VAN OORD, F.H. JONKER, N. PARVIZI, G.C. VAN DER WEIJDEN, M.A.M. TAVERNE. 2010. Fetal movements during late gestation in the pig: A longitudinal ultrasonographic study. *Theriogenology* **74**:24-30.
- CUC, N.T.K., H. SIMIANER, H. EDING, H.V. TIEU, V.C. CUONG, C.B.A. WOLLNY, L.F. GROENEVELD, AND S. WEIGEND. 2010. Assessing genetic diversity of Vietnamese local chicken breeds using microsatellites. *Anim Genet* **41**:545-547.
- DÄNICKE, S., M. BEYER, G. BREVES, H. VALENTA, AND H.-U. HUMPF. 2010. Effects of oral exposure of pigs to deoxynivalenol (DON) sulfonate (DONS) as the non-toxic derivative of DON on tissue residues of DON and de-epoxy-DON and on DONS blood levels. *Food Addit Contam A* **27**:1558-1565.
- DÄNICKE, S. AND S. DÖLL. 2010. A probiotic feed additive containing spores of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* does not prevent absorption and toxic effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol in piglets. *Food Chem Tox* **48**:152-158.
- DÄNICKE, S., A.-K. HEGEWALD, S. KAHLERT, J. KLUSS, H.-J. ROTHKÖTTER, G. BREVES, AND S. DÖLL. 2010. Studies on the toxicity of deoxynivalenol (DON), sodium metabisulfite, DON-sulfonate (DONS) and de-epoxy-DON for porcine peripheral blood mononuclear cells and the Intestinal Porcine Epithelial Cell lines IPEC-1 and IPEC-J2, and on effects of DON and DONS on piglets. *Food Chem Tox* **48**:2154-2162.
- DÄNICKE, S., C. KEESE, T. GOYARTS, AND S. DÖLL. 2010. Effects of deoxynivalenol (DON) and related compounds on bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro* and *in vivo*. *Mycotox Res* [Epub ahead of print; doi:10.1007/s12550-010-0074-3]
- DÄNICKE, S., G. PAHLOW, M. BEYER, T. GOYARTS, G. BREVES, H. VALENTA, AND H.-U. HUMPF. 2010. Investigations on the kinetics of the concentration of deoxynivalenol (DON) and on spoilage by moulds and yeasts of wheat grain preserved with sodium metabisulfite (Na₂S₂O₅, SBS) and propionic acid at various moisture contents. *Arch Anim Nutr* **64**:190-203.
- DAMRIYASA, I. M., G. SCHARES, AND C. BAUER. 2010. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in *Bos javanicus* ('Bali cattle') from Indonesia. *Trop Anim Health Prod* **42**:95-98.
- DESHMUKH, R.S., O. ØSTRUP, E. ØSTRUP, M. VEJLSTED, H. NIEMANN, A. LUCAS-HAHN, B. PETERSEN, J. LI, H. CALLESEN, AND P. HYTTEL. 2010. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed *in vivo* and produced by *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Epigenetics* **6** [Epub ahead of print; doi:10.4161/epi.6.2.13519]
- DETMANN, A., Y. JÄSCHKE, I. TRIEBEL, J. BOGS, I. SCHRÖDER, AND H.-J. SCHÜLLER. 2010. Mediator subunits and histone methyltransferase Set2 contribute to Ino2-dependent transcriptional activation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **283**:211-221.
- DIESING, A.-K., C. NOSSOL, P. PANTHER, N. WALK, A. POST, J. KLUSS, P. KREUTZMANN, S. DÄNICKE, H.-J. ROTHKÖTTER, AND S. KAHLERT. 2010. Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. *Toxicol Lett* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.toxlet.2010.10.006]
- DLABOLA, J., K. HENNING, A. HILBERT, C. MENGE, I. MOSER, A. SCHNEEBERG, C. SEYBOLDT, L. SPRAGUE, H. TOMASO, AND H. NEUBAUER. 2010. Bakterielle Infektionen bei Nutztieren. *Prakt Tierarzt* **91**:986-998.
- DROEBNER, K., B. KLEIN, S. PAXIAN, R. SCHMID, L. STITZ, AND O. PLANZ. 2010. The Alternative NF-kappa B Signalling Pathway is a Prerequisite for an Appropriate Immune Response Against Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *Viral Immunol* **23**:295-308.
- DUCHEV, Z., T.V.C. CONG, AND E. GROENEVELD. 2010. CryoWEB: Web software for the documentation of the cryo-preserved material in animal gene banks. *Bioinformatics* **5**:219-220.
- DUCROT, C., C. SALA, G. RU, A. DE KOEIJER, H. SHERIDAN, C. SAEGERMAN, T. SELHORST, M. ARNOLD, M.P. POLAK, AND D. CALAVAS. 2010. Modelling BSE trend over time in Europe, a risk assessment perspective. *Eur J Epidemiol* **25**:411-419.
- EIDEN, M., C. HOFFMANN, A. BALKEMA-BUSCHMANN, M. MÜLLER, K. BAUMGARTNER, AND M.H. GROSCHUP. 2010. Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah. *J Gen Virol* **91**:2874-2883.
- EIDEN, M., A. VINA-RODRIGUEZ, B. HOFFMANN, U. ZIEGLER, AND M.H. GROSCHUP. 2010. Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 *West Nile virus* strains. *J Vet Diagn Invest* **22**:748-753.
- ENZMANN, P.-J., J. CASTRIC, G. BOVO, R. THIERY, D. FICHTNER, H. SCHÜTZE, AND T. WAHLI. 2010. Evolution of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), a fish rhabdovirus, in Europe over 20 years: implications for control. *Dis Aquat Org* **89**:9-15.
- ESCHBAUMER, M., R. WÄCKERLIN, B. HOFFMANN, AND M. BEER. 2010. Detection of bluetongue virus genome after vaccination with an inactivated vaccine. *Vaccine* **28**:881-882.
- ESCHBAUMER, M., R. WÄCKERLIN, M. RUDOLF, M. KELLER, P. KÖNIG, J. ZEMKE, B. HOFFMANN, AND M. BEER. 2010. Infectious blood or culture-grown virus: A comparison of bluetongue virus challenge models. *Vet Microbiol* **146**:150-154.

- ESCHBAUMER, M., B. HOFFMANN, A. MOSS, G. SAVINI, A. LEONE, P. KÖNIG, J. ZEMKE, F. CONRATHS, AND M. BEER. 2010. Emergence of bluetongue virus serotype 6 in Europe – German field data and experimental infection of cattle. *Vet Microbiol* **143**:189-195.
- FABER, M.S., R.G. ULRICH, S.O. BROCKMANN, G.M. PFAFF, J. JACOB, D.H. KRÜGER, AND K. STARK. 2010. Steep rise in notified hantavirus infections in Germany, April 2010. *EuroSurveillance* **15**:20.
- FEREIDOUNI, S.R., C. GRUND, R. HÄUSLAIGNER, E. LANGE, H. WILKING, T.C. HARDER, M. BEER, AND E. STARICK. 2010. Dynamics of Specific Antibody Responses Induced in Mallards After Infection by or Immunization with Low Pathogenicity Avian Influenza Viruses. *Avian Dis* **54**:79-85.
- FEREIDOUNI, S.R., O. WERNER, E. STARICK, M. BEER, T.C. HARDER, M. AGHAKHAN, H. MODIRROUSTA, H. AMINI, M.K. MOGHADDAM, M.H. BOZORGHMEHRIFARD, M.A. AKHAVIZADEGAN, N. GAIDET, S.H. NEWMAN, S. HAMMOUMI, G. CATTOLI, A. GLOBIG, B. HOFFMANN, M.E. SEHATI, S. MASOODI, T. DODMAN, W. HAGEMEIJER, S. MOUSAKHANI, T.C. METTENLEITER. 2010. Avian influenza virus monitoring in wintering waterbirds in Iran, 2003-2007. *Virol J* **7**:43.
- FESSLER, A.T., C. BILLERBECK, K. KADLEC, AND S. SCHWARZ. 2010. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother* **65**:1576-1582.
- FESSLER, A., C. SCOTT, K. KADLEC, R. EHRLICH, S. MONECKE, AND S. SCHWARZ. 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother* **65**:619-625.
- FINKE, S., H. GRANZOW, J. HURST, R. POLLIN, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Intergenotypic Replacement of Lyssavirus Matrix Proteins Demonstrates the Role of Lyssavirus M Proteins in Intracellular Virus Accumulation. *J Virol* **84**:1816-1827.
- FISCHER, K., J.P. LINDNER, AND U. BAULAIN. 2010. Influence on intramuscular fat content of pork. *Fleischwirtschaft* **90**:96-102.
- FLACHOWSKY, G. 2010. Prospective of Genetically Modified Feeds for Livestock Production. *Anim Nutr Feed Technol* **105**:155-168.
- FLACHOWSKY, G. AND C. WENK. 2010. The role of animal feeding trials for the nutritional and safety assessment of feeds from genetically modified plants – Present stage and future challenges. *J Anim Feed Sci* **19**:149-170.
- FRIMMEL, S., A. KRIENKE, D. RIEBOLD, M. LÖBERMANN, M. LITTMANN, K. FIEDLER, C. KLAUS, J. SÜSS, AND E.C. REISINGER. 2010. Tick-borne encephalitis virus in humans and ticks in Northeastern Germany. *Dtsch Med Wochenschr* **135**:1393-1395.
- FRICTSCHER-RAVENS, A., T. CUMING, C.F. EISENBERGER, M. GHADIMI, A. NILGES, P. MEYBOHM, S. SCHIFFMANN, B. JACOBSEN, F. SEEHUSEN, H. NIEMANN, AND W.T. KNOEFEL. 2010. Randomized comparative long-term survival study of endoscopic and thoracoscopic esophageal wall repair after NOTES mediastinoscopy in healthy and compromised animals. *Endoscopy* **42**:468-474.
- FRICTSCHER-RAVENS, A., J. HAMPE, P. GRANGE, C. HOLLAND, F. OLAGBEYE, P. MILLA, A. VON HERBAY, B. JACOBSEN, F. SEEHUSEN, K.-G. HADELER, AND K. MANNUR. 2010. Clip closure versus endoscopic suturing versus thoracoscopic repair of an iatrogenic esophageal perforation: A randomized, comparative, long-term survival study in a porcine model (with videos). *Gastrointest Endosc* **72**:1020-1026.
- FUGLEM, B., E. JIRILLO, I. BJERKÅS, H. KIYONO, T. NOCHI, Y. YUKI, M. RAIDA, U. FISCHER, AND E.O. KOPPANG. 2010. Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Dev Comp Immunol* **34**:768-774.
- GAC, M., J. BIGDA, AND T.W. VAHLENKAMP. 2010. Increased mitochondrial superoxide dismutase expression and lowered production of reactive oxygen species during rotavirus infection. *Virology* **404**:293-303.
- GAEDE, W., K.-F. RECKLING, A. SCHLIEPHAKE, D. MISSAL, H. HOTZEL, AND K. SACHSE. 2010. Detection of *Chlamydomphila caviae* and *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* in horses with signs of rhinitis and conjunctivitis. *Vet Microbiol* **142**:440-444.
- GALE, P., A. ESTRADA-PEÑA, M. MARTINEZ, R.G. ULRICH, A. WILSON, G. CAPELLI, P. PHIPPS, A. DE LA TORRE, M.J. MUÑOZ, M. DOTTORI, V. MIOULET, AND A.R. FOOKS. 2010. The feasibility of developing a risk assessment for the impact of climate change on the emergence of Crimean-Congo haemorrhagic fever in livestock in Europe: a Review. *J Appl Microbiol* **108**:1859-1870.
- GARCIA-HERREROS, M., T.F. CARTER, D.A.F. VILLAGÓMEZ, A.D. MACAULAY, D. RATH, W.A. KLING, AND P. LONERGAN. 2010. Incidence of chromosomal abnormalities in bovine blastocysts derived from unsorted and sex-sorted spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **22**:1272-1278.
- GEUE, L., S. SCHARLES, B. MINTEL, F.J. CONRATHS, E. MÜLLER, AND R. EHRLICH. 2010. Rapid Microarray-Based Genotyping of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O156:H25/H /Hnt Isolates from Cattle and Clonal Relationship Analysis. *Appl Environ Microbiol* **76**:5510-5519.
- GOHRBANDT, S., J. VEITS, J. HUNDT, J. BOGS, A. BREITHAUP, J.P. TEIFKE, S. WEBER, T.C. METTENLEITER, AND J. STECH. 2010. Amino acids adjacent to the haemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5. *J Gen Virol* [Epub ahead of print; doi:10.1099/vir.0.023887-0]
- GOLETIĆ, T., A. GAGIĆ, E. REŠIDBEGOVIĆ, A. KUSTURA, A. KAVAZOVIĆ, V. SAVIĆ, T. HARDER, E. STARICK, AND S. PRAŠOVIĆ. 2010. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N1 in Mute Swans (*Cygnus olor*) in Central Bosnia. *Avian Dis* **54**:496-501.
- GOLLER, K.V., R.D. FYMAGWA, V. NIKOLIN, M.L. EAST, M. KILEWO, S. SPECK, T. MÜLLER, M. MATZKE, AND G. WIBBELT. 2010. Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Vet Microbiol* **146**:245-252.

- GONZÁLEZ, L., S. SISÓ, E. MONLÉON, C. CASALONE, L.J.M. VAN KEULEN, A. BALKEMA-BUSCHMANN, A. ORTIZ-PELÁEZ, B. IULINI, J.P.M. LANGEVELD, C. HOFFMANN, J.J. BADIOLA, J. JEFFREY, AND C. ACIN. 2010. Variability in disease phenotypes within a single PRNP genotype suggests the existence of multiple natural sheep scrapie strains within Europe. *J Gen Virol* **91**:2630-2641.
- GÖTZE, A., A. HONNENS, G. FLACHOWSKY, AND H. BOLLWEIN. 2010. Variability of mammary blood flow in lactating Holstein-Friesian cows during the first twelve weeks of lactation. *J Dairy Sci* **93**:38-44.
- GOYARTS, T., K.-P. BRÜSSOW, H. VALENTA, U. TIEMANN, K. JÄGER, AND S. DÄNICKE. 2010. On the effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) administered per os or intraperitoneal infusion to sows during days 63 to 70 of gestation. *Mycotox Res* **26**:119-131.
- GRIFFITHS, P.C., J. SPIROPOULOS, R. LOCKEY, A.C. TOUT, D. JAYASENA, J.M. PLATER, A. CHAVE, R.B. GREEN, S. SIMONINI, L. THORNE, I. DEXTER, A. BALKEMA-BUSCHMANN, M.H. GROSCHUP, V. BÉRINGUE, A. LE DUR, H. LAUDE, AND J. HOPE. 2010. Characterization of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol* **91**:2132-2138.
- GROENEVELD, E. 2010. Pedigree-basiertes Management und Monitoring genetischer Vielfalt in Zuchtpopulationen. *Züchtungskunde* **82**:29-39.
- GROENEVELD, L.F., M.B. BLANCO, J.-L. RAHARISON, V. RAHALINARIVO, R.M. RASOLOARISON, P.M. KAPPELER, L.R. GODFREY, AND M.T. IRWIN. 2010. MtDNA and nDNA corroborate existence of sympatric dwarf lemur species at Tsinjoarivo, eastern Madagascar. *Mol Phylogenet Evol* **55**:833-845.
- GROENEVELD, L.F., J.A. LENSTRA, H. EDING, M.A. TORO, B. SCHERF, D. PILLING, R. NEGRINI, E.K. FINLAY, H. JIANLIN, E. GROENEVELD, AND S. WEIGEND. 2010. Genetic diversity in farm animals – a review. *Anim Genet* **41**:6-31.
- GUENTHER, S., M. GROBBEL, J. BEUTLICH, B. GUERRA, R.G. ULRICH, L.H. WIELER, AND C. EWERS. 2010. Detection of pandemic B2-025-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum β -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J Antimicrob Chemother* **65**:582-584.
- GUENTHER, S., M. GROBBEL, K. HEIDEMANNS, M. SCHLEGEL, R.G. ULRICH, C. EWERS, AND L.H. WIELER. 2010. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Sci Total Environ* **408**:3519-3522.
- GWIDA, M., S. AL DAHOUK, F. MELZER, U. RÖSLER, H. NEUBAUER, AND H. TOMASO. 2010. Brucellosis – Regionally Emerging Zoonotic Disease? *Croat Med J* **51**:289-295.
- HAASE, M., E. STARICK, S. FEREIDOUNI, G. STREBELOW, C. GRUND, A. SEELAND, C. SCHEUNER, D. CIESLIK, K. SMETANKA, Z. MINTA, O. ZORMAN-ROJS, M. MOJZIS, T. GOLETIC, V. JESTIN, B. SCHULENBURG, O. PYBUS, T. METTENLEITER, M. BEER, AND T. HARDER. 2010. Possible sources and spreading routes of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 infections in poultry and wild birds in Central Europe in 2007 inferred through likelihood analyses. *Infect Genet Evol* **10**:1075-1084.
- HAFEZ, M.H., A. ARAFA, E.M. ABDELWHAB, A. SELIM, S.G. KHOULOSY, M.K. HASSAN, AND M.M. ALY. 2010. Avian influenza H5N1 virus infections in vaccinated commercial and backyard poultry in Egypt. *Poultry Sci* **89**:1609-1613.
- HARDER, T. AND T.W. VAHLENKAMP. 2010. Influenza virus infections in dogs and cats. *Vet Immunol Immunopathol* **134**:54-60.
- HAURI, A.M., I. HOFSTETTER, E. SEIBOLD, P. KAYSSER, J. ECKERT, H. NEUBAUER, AND W.D. SPLETTSTOESSER. 2010. Investigating an Airborne Tularemia Outbreak, Germany. *Emerg Infect Dis* **16**:238-243.
- HASSOUN, R., P. SCHWARTZ, D. RATH, C. VIEBAHN, AND J. MÄNNER. 2010. Germ layer differentiation during early hindgut and cloaca formation in rabbit and pig embryos. *J Anat* **217**:665-678.
- HAUSCHILD, T. AND S. SCHWARZ. 2010. Macrolide resistance in *Staphylococcus* spp. from free-living small mammals. *Vet Microbiol* **144**:530-531.
- HERRMANN, D.C., N. PANTCHEV, M.G. VRHOVEC, D. BARUTZKI, H. WILKING, A. FRÖHLICH, C.G. K. LÜDER, F.J. CONRATHS, AND G. SCHARES. 2010. Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. *Int J Parasitol* **40**:285-292.
- HERZOG, K., M. BROCKHAN-LÜDEMANN, M. KASKE, N. BEINDORFF, V. PAUL, H. NIEMANN, AND H. BOLLWEIN. 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* **73**:691-697.
- HERZOG, K., C. VOSS, J.P. KASTELIC, N. BEINDORFF, V. PAUL, H. NIEMANN, AND H. BOLLWEIN. 2010. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology* [Epub ahead of print: doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.024]
- HILDEBRANDT, E., M. FELDMANN, N. GUNDLING, K. SACHSE, AND M. HOEDEMAKER. 2010. Untersuchungen von Sammelproben zur Diagnose der Mykoplasmenmastitis. *Tierärztl Prax* **38(G)**:79-83.
- HÖRETH-BÖNTGEN, D. AND W. BÖHLE. 2010. „Exotische Tierseuchen“ – worauf sollten wir uns vorbereiten? *Prakt Tierarzt* **91**:506-512.
- HOFFMANN, B., C.M. FREULING, P.R. WAKELEY, T.B. RASMUSSEN, S. LEECH, A.R. FOOKS, M. BEER, AND T. MÜLLER. 2010. Improved safety for molecular diagnosis of classical rabies viruses by use of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR “double check” strategy. *J Clin Microbiol* **48**:3970-3978.
- HOFFMANN, B., T. HARDER, E. LANGE, D. KALTHOFF, I. REIMANN, C. GRUND, R. OEHME, T.W. VAHLENKAMP, AND M. BEER. 2010. New real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions facilitate detection and differentiation of novel A/H1N1 influenza virus in porcine and human samples. *Berl Münch Tierärztl Wschr* **123**:286-292.
- HOGAN, N.S., K.S. LEE, B. KÖLLNER, AND M.R. VAN DEN HEUVEL. 2010. The effects of the alkyl polycyclic aromatic hydrocarbon retene on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response. *Aquat Toxicol* **100**:246-254.

- HOSSEININEJAD, M., F. HOSSEINI, M. MOSHARRAF, S. SHABBAZ, M. MAH-ZOUNIEK, AND G. SCHARES. 2010. Development of an indirect ELISA test using an affinity purified surface antigen (P38) for sero-diagnosis of canine *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* **171**:337-342.
- HU, W., S. NESSLER, B. HEMMER, T.N. EAGAR, L.P. KANE, S.R. LELIVELD, A. MÜLLER-SCHIFFMANN, A.R. GOCKE, A. LOVETT-RACKE, L.-H. BEN, R.Z. HUSSAIN, A. BREIL, J.L. ELLIOTT, K. PUTTAPARTHI, P.D. CRAVENS, M.P. SINGH, B. PETSCH, L. STITZ, M.K. RACKE, C. KORTH, AND O. STÜVE. 2010. Pharmacological prion protein silencing accelerates central nervous system autoimmune disease via T cell receptor signalling. *Brain* **133**:375-388.
- HÜBNER, K. AND L. PHI-VAN. 2010. Sp1 and Sp3 regulate transcription of the chicken GAS41 gene. *Biochim Biophys Acta* **1799**:442-447.
- IQBAL, K., W.A. KUES, U. BAULAIN, W. GARRELS, D. HERRMANN, AND H. NIEMANN. 2010. Species-Specific Telomere Length Differences Between Blastocyst Cell Compartments and Ectopic Telomere Extension in Early Bovine Embryos by Human Telomerase Reverse Transcription. *Biol Reprod* [Epub ahead of print; doi:10.1095/biolreprod.110.087205]
- IRENGE, L.M., J.-F. DURANT, H. TOMASO, P. PILO, J.S. OLSEN, V. RAMISSE, J. MAHILLON, AND J.-L. GALA. 2010. Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**:1179-1192.
- JACOBSEN, I.D., K. GROSSE, S. SLESIONA, B. HUBE, A. BERNDT, AND M. BROCK. 2010. Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun* **78**:2995-3006.
- JOHNE, R., G. HECKEL, A. PLENGE-BÖNIG, E. KINDLER, C. MARESCH, J. REETZ, A. SCHIELKE, AND R.G. ULRICH. 2010. Novel Hepatitis E Virus Genotype in Norway Rats, Germany. *Emerg Infect Dis* **16**:1452-1455.
- JOHNE, R., A. PLENGE-BÖNIG, M. HESS, R.G. ULRICH, J. REETZ, AND A. SCHIELKE. 2010. Detection of a novel hepatitis B-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* **91**:750-758.
- JOHNSON, N., H. UN, A.R. FOOKS, C. FREULING, T. MÜLLER, O. AYLAN, AND A. VOS. 2010. Rabies epidemiology and control in Turkey: past and present. *Epidemiol Infect* **138**:305-312.
- JOHNSON, N., A. VOS, C. FREULING, N. TORDO, A.R. FOOKS, AND T. MÜLLER. 2010. Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Vet Microbiol* **142**:151-159.
- JONSTRUP, S.P., H. SCHUETZE, G. KURATH, T. GRAY, B. BANG JENSEN, AND N.J. OLESEN. 2010. An isolate and sequence database of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV). *J Fish Dis* **33**:469-471.
- KADEN, V., E. LANGE, H. KÜSTER, T. MÜLLER, AND B. LANGE. 2010. An update on safety studies on the attenuated „RIEMSER® Schweinepestoralvakzine“ for vaccination of wild boar against classical swine fever. *Vet Microbiol* **143**:133-138.
- KADLEC, K., C.F. POMBA, N. COUTO, AND S. SCHWARZ. 2010. Small plasmids carrying *vga(A)* or *vga(C)* genes mediate resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from swine. *J Antimicrob Chemother* **65**:2692-2693.
- KADLEC, K. AND S. SCHWARZ. 2010. Identification of a Plasmid-Borne Resistance Gene Cluster Comprising the Resistance Genes *erm(T)*, *dfcK*, and *ter(L)* in a Porcine Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Strain. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:915-918.
- KADLEC, K. AND S. SCHWARZ. 2010. Identification of the novel *dfcK*-carrying transposon Tn559 in a porcine methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:3475-3477.
- KADLEC, K., S. SCHWARZ, V. PERRETTEN, U.G. ANDERSSON, M. FINN, C. GREKO, A. MOODLEY, S.A. KANIA, L.A. FRANK, D.A. BEMIS, A. FRANCO, M. IURESCIA, A. BATTISTI, B. DUIM, J.A. WAGENAAR, E. VAN DUJKEREN, J.S. WEESE, J.R. FITZGERALD, A. ROSSANO, AND L. GUARDABASSI. 2010. Molecular analysis of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. *J Antimicrob Chemother* **65**:1826-1828.
- KALETA, E.F., O. WERNER, AND Y. HEMBERGER. 2010. Isolation and characterization of avian paramyxovirus type 3b from farmed Namibian ostriches (*Struthio camelus f. dom.*). *Berl Münch Tierärztl Wschr* **123**:103-110.
- KALTHOFF, D., A. GIRITCH, K. GEISLER, U. BETTMANN, V. KLIMYUK, H.-R. HEHNER, Y. GLEBA, AND M. BEER. 2010. Immunization with plant-expressed hemagglutinin protects chickens from lethal highly pathogenic avian influenza virus H5N1 challenge infection. *J Virol* **84**:12002-12010.
- KALTHOFF, D., A. GLOBIG, AND M. BEER. 2010. (Highly pathogenic) avian influenza as a zoonotic agent. *Vet Microbiol* **140**:237-245.
- KALTHOFF, D., C. GRUND, T.C. HARDER, E. LANGE, T.W. VAHLENKAMP, T.C. METTENLEITER, AND M. BEER. 2010. Limited Susceptibility of Chickens, Turkeys, and Mice to Pandemic (H1N1) 2009 Virus. *Emerg Infect Dis* **16**:703-705.
- KALTHOFF, D., P. KÖNIG, S. TRAPP, AND M. BEER. 2010. Immunization and challenge experiments with a new modified live bovine herpesvirus type 1 marker vaccine prototype adjuvanted with a co-polymer. *Vaccine* **28**:5871-5877.
- KAMMERER, R. AND W. ZIMMERMANN. 2010. Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC Biology* **8**:12.
- KAMPEN, H. AND D. WERNER. 2010. Three years of bluetongue disease in central Europe with special reference to Germany: what lessons can be learned? *Wien Klin Wschr* **122** (Suppl. 3):31-39.
- KARGER, A., B. BETTIN, M. LENK, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Rapid characterisation of cell cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric typing. *J Virol Meth* **164**:116-121.

- KEHR, C., M. KLUNKER, R. FISCHER, E. GROENEVELD, AND U. BERGFELD. 2010. Untersuchungen zu einem Monitoring genetischer Diversität bei Nutztierassen: Ergebnisse zum Roten Höhenvieh. *Züchtungskunde* **82**(5).
- KEIL, G.M., C. KLOPFLEISCH, K. GIESOW, AND J. VEITS. 2010. Protein display by bovine herpesvirus type 1 glycoprotein B. *Vet Microbiol* **143**:29-36.
- KELLER, C., C. ROOS, F. GROENEVELD, J. FISCHER, AND D. ZINNER. 2010. Introgressive Hybridization in Southern African Baboons Shapes Patterns of mtDNA Variation. *Am J Phys Anthropol* **142**:125-136.
- KIELPINSKI, M., J. KEMPTER, R. PANICZ, J. SADOWSKI, H. SCHÜTZE, S. OHLEMEYER, AND S.M. BERGMANN. 2010. Detection of KHV in Freshwater Mussels and Crustaceans from Ponds with KHV History in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Isr J Aquacult – Bamidgah* **62**:28-37.
- KLAUS, C., B. HOFFMANN, M. BEER, W. MÜLLER, B. STARK, W. BADER, K. STIASNY, F.X. HEINZ, AND J. SÜSS. 2010. Seroprevalence of tick-borne encephalitis (TBE) in naturally exposed monkeys (*Macaca sylvanus*) and sheep and prevalence of TBE virus in ticks in a TBE endemic area in Germany. *Ticks Tick-borne Dis* **1**:141-144.
- KLAUS, C., B. HOFFMANN, U. HERING, B. MIELKE, K. SACHSE, M. BEER, AND J. SÜSS. 2010. Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin Microbiol Infect* **16**:238-244.
- KLAUS, C., B. HOFFMANN, U. MOOG, U. SCHAU, M. BEER, AND J. SÜSS. 2010. Can goats be used as sentinels for Tick-borne encephalitis (TBE) in non-endemic areas? Experimental studies and epizootiological observations. *Berl Münch Tierärztl Wschr* **123**:441-445.
- KLEIN, S., S. PETERSEN, U. TAYLOR, D. RATH, AND S. BARCIKOWSKI. 2010. Quantitative visualization of colloidal and intracellular gold nanoparticles by confocal microscopy. *J Biomed Opt* **15**:036015.
- KLEINSCHMIDT, N., R. KOOPMANN, J. DEMELER, AND G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA. 2010. Verminderte Wirkung von Anthelmintika gegen Rindernematoden. *Landbauforschung – vTI* **60**:151-156.
- KLOPFLEISCH, C., L.Q. MINH, K. GIESOW, S. CURRY, AND G.M. KEIL. 2010. Effect of foot-and-mouth disease virus capsid precursor protein and 3C protease expression on bovine herpesvirus 1 replication. *Arch Virol* **155**:723-731.
- KNOBLOCH, H., W. SCHROEDL, C. TURNER, M. CHAMBERS, AND P. REINHOLD. 2010. Electronic nose responses and acute phase proteins correlate in blood using a bovine model of respiratory infection. *Sensor Actuator B Chem* **144**:81-87.
- KNOOP, E.V., C.M. FREULING, J. KLIEMT, T. SELHORST, F.J. CONRATHS, AND T. MÜLLER. 2010. Evaluation of a commercial rabies ELISA as a replacement for serum neutralization assays as part of the pet travel scheme and oral vaccination campaigns of foxes. *Berl Münch Tierärztl Wschr* **123**:278-285.
- KOCHZIUS, M., C. SEIDEL, A. ANTONIOU, S.K. BOTLA, D. CAMPO, A. CARIANI, E.G. VAZQUEZ, J. HAUSCHILD, C. HERVET, S. HJÖRLEIFSDOTTIR, G. HREGGVIDSSON, K. KAPPEL, M. LANDI, A. MAGOULAS, V. MARTEINSSON, M. NÖLTE, S. PLANES, F. TINTI, C. TURAN, M.N. VENUGOPAL, H. WEBER, AND D. BLOHM. Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *PLoS ONE* **5**(9):e12620.
- KOPPANG, E.O., U. FISCHER, L. MOORE, M.A. TRANULIS, J.M. DIJKSTRA, B. KÖLLNER, L. AUNE, E. JIRILLO, AND I. HORDVIK. 2010. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbrachial lymphoid tissue. *J Anat* **217**:728-739.
- KREIENBROCK, L., H. WILLMS, T. SELHORST, A. OVELHEY, L. HAAS, V. MOENNIG, AND M. KRAMER. 2010. Risiken der Übertragung der Maul- und Klauenseuche in einer viehdichten Region in Deutschland – Ergebnisse einer empirischen Expertenbefragung. *Berl Münch Tierärztl Wschr* **123**:89-95.
- KUCINSKAITE-KODZE, I., R. PETRAITYTE-BURNEIKIENE, A. ZVIRBLIENE, B. HJELLE, R.A. MEDINA, A. GEDVILAITE, A. RAZANSKIENE, J. SCHMIDT-CHANASIT, M. MERTENS, P. PADULA, K. SASNAUSKAS, AND R.G. ULRICH. 2010. Characterization of monoclonal antibodies against hantavirus nucleocapsid protein and their use for immunohistochemistry on rodent and human samples. *Arch Virol* [Epub ahead of print; doi: 10.1007/s00705-010-0879-6]
- KUCZIUS, T., J. WOHLERS, H. KARCH, AND M.H. GROSCHUP. 2010. Subtyping of human cellular prion proteins and their differential solubility. *Exp Neurol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.expneurol.2010.10.014]
- KUES, W.A., M. NOWAK-IMIALEK, S. HARIDOSS, AND H. NIEMANN. 2010. Strategies for the Derivation of Pluripotent Cells from Farm Animals. *Reprod Dom Anim* **45** (Suppl. 3):25-31.
- KUETEMEYER, K., A. LUCAS-HAHN, B. PETERSEN, E. LEMME, P. HASSEL, H. NIEMANN, AND A. HEISTERKAMP. 2010. Combined multiphoton imaging and automated functional enucleation of porcine oocytes using femtosecond laser pulses. *J Biomed Opt* **15**:046006.
- KUHN, J., T. LEEGE, H. GRANZOW, W. FUCHS, T.C. METTENLEITER, AND B.G. KLUPP. 2010. Analysis of pseudorabies and herpes simplex virus recombinants simultaneously lacking the pUL17 and pUL25 components of the C-capsid specific component. *Virus Res* **153**:20-28.
- LANG, K.S., J.M. ANDERSON, S. SCHWARZ, L. WILLIAMSON, J. HANDELSMANN, AND R.S. SINGER. 2010. Novel Florfenicol and Chloramphenicol Resistance Gene Discovered in Alaskan Soil Using Functional Metagenomics. *Appl Environ Microbiol* **76**:5321-5326.
- LANGE, M., H. NEUBAUER, AND C. SEYBOLDT. 2010. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Mol Cell Probes* **24**:204-210.
- LAROUCAU, K., F. VORIMORE, K. SACHSE, E. VRETOU, V.I. STARKOU, H. WILLEMS, S. MAGNINO, A. RODOLAKIS, AND P.M. BAVOIL. 2010. Differential identification of *Chlamydophila abortus* live vaccine strain 1B and *C. abortus* field isolates by PCR-RFLP. *Vaccine* **28**:5653-5656.

- LEBEDEVA, I.Y., V.A. LEBEDEV, R. GROSSMANN, AND N. PARVIZI. 2010. Age-dependent role of steroids in the regulation of growth of the hen follicular wall. *Reprod Biol Endocrinol* **8**:15.
- LEHMBECKER, A., F. PFEIFER, I. MOSER, AND P. WOHLSEIN. 2010. Spontane enzootische aviäre Tuberkulose bei Hauskaninchen (*Oryctolagus cuniculus f. dom.*). *Kleintierpraxis* **55**:21-24.
- LEIBBRANDT, A., C. MEIER, M. KÖNIG-SCHUSTER, R. WEINMÜLLER, D. KALTHOFF, B. PFLUGFELDER, P. GRAF, B. FRANK-GEHRKE, M. BEER, T. FAZEKAS, H. UNGER, E. PRIESCHL-GRASSAUER, AND A. GRASSAUER. 2010. Iota-Carrageenan Is a Potent Inhibitor of Influenza A Virus Infection. *PLoS ONE* **5**:e14320.
- LEIFER, I., H. EVERETT, B. HOFFMANN, O. SOSAN, H. CROOKE, M. BEER, AND S. BLOME. 2010. Escape of classical swine fever C-strain vaccine virus from detection by C-strain specific real-time RT-PCR caused by a point mutation in the primer-binding site. *J Virol Meth* **166**:98-100.
- LEIFER, I., B. HOFFMANN, D. HÖPER, T.B. RASMUSSEN, S. BLOME, G. STREBELOW, D. HÖRETH-BÖNTGEN, C. STAUBACH, AND M. BEER. 2010. Molecular epidemiology of current classical swine fever virus isolates of wild boar in Germany. *J Gen Virol* **91**:2687-2697.
- LEONHARDT, R.M., D. FIEGL, E. RUFER, A. KARGER, B. BETTIN, AND M.R. KNITTLER. 2010. Post-Endoplasmic Reticulum Rescue of Unstable MHC Class I Requires Proprotein Convertase PC7. *J Immunol* **184**:2985-2998.
- LIEBLER-TENORIO, E.M. 2010. Alterations of the intestinal barrier in calf diarrhoea. 2010. *Cattle Pract* **18**:123-126.
- MA, W., D. BRENNER, Z. WANG, B. DAUBER, C. EHRHARDT, K. HÖGNER, S. HEROLD, S. LUDWIG, T. WOLFF, K. YU, J.A. RICHT, O. PLANZ, AND S. PLESCHKA. 2010. The NS Segment of an H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (HPAIV) Is Sufficient To Alter Replication Efficiency, Cell Tropism and Host Range of an H7N1 HPAIV. *J Virol* **84**:2122-2133.
- MAAN, S., N.S. MAAN, P.A. VAN RIJN, R.G.P. VAN GENNIP, A. SANDERS, I.M. WRIGHT, C. BATTEN, B. HOFFMANN, M. ESCHBAUMER, C.A.L. OURA, A.C. POTGIETER, K. NOMIKOU, AND P.P.C. MERTENS. 2010. Full Genome Characterisation of Bluetongue Virus Serotype 6 from the Netherlands 2008 and Comparison to Other Field and Vaccine Strains. *PLoS ONE* **5**:e10323.
- MÄNZ, B., V. GÖTZ, K. WUNDERLICH, J. EISEL, J. KIRCHMAIR, J. STECH, O. STECH, G. CHASE, R. FRANK, AND M. SCHWEMMLE. 2010. Disruption of the viral polymerase complex assembly as a novel approach to attenuate influenza A virus. *J Biol Chem* [Epub ahead of print; doi:10.1074/jbc.M110.205534]
- MAIER, T., A. SCHWARTING, D. MAUER, R.S. ROSS, A. MARTENS, V. KLIEM, J. WAHL, M. PANNING, S. BAUMGARTE, T. MÜLLER, S. PFEFFERLE, H. EBEL, J. SCHMIDT, K. TENNER-RACZ, P. RACZ, M. SCHMID, M. STRÜBER, B. WOLTERS, D. GOTTHARDT, F. BITZ, L. FRISCH, N. PFEIFFER, H. FICKENSCHER, P. SAUER, C.E. RUPPRECHT, M. ROGGENDORF, A. HAVE-RICH, P. GALLE, J. HOYER, AND C. DROSTEN. 2010. Management and Outcomes after Multiple Corneal and Solid Organ Transplantations from a Donor Infected with Rabies Virus. *Clin Infect Dis* **50**:1112-1119.
- MAJZOUB, M., W. BREUER, N.S. GOLLNICK, A. ROSTAHER, G. SCHARS, AND W. HERRMANN. 2010. Ein Ausbruch von Besnoitiose bei Rindern in Deutschland: pathomorphologische, ultrastrukturelle und molekularbiologische Untersuchungen. *Wien Tierärztl Mschr* **97**:9-15.
- MANTEUFFEL, G., A. MANNEWITZ, C. MANTEUFFEL, A. TUCHSCHERER, AND L. SCHRADER. 2010. Social hierarchy affects the adaption of pregnant sows to a call feeding learning paradigm. *Appl Anim Behav Sci* **128**:30-36.
- MARESCH, C., H. GRANZOW, A. NEGATSCH, B.G. KLUPP, W. FUCHS, J.P. TEIFKE, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Ultrastructural Analysis of Virion Formation and Anterograde Intraaxonal Transport of the Alphaherpesvirus Pseudorabies Virus in Primary Neurons. *J Virol* **84**:5528-5539.
- MAYER-SCHOLL, A., A. DRAEGER, E. LUGE, R. ULRICH, AND K. NÖCKLER. 2010. Comparison of Two PCR Systems for the Rapid Detection of *Leptospira* spp. from Kidney Tissue. *Curr Microbiol* [Epub ahead of print; doi:10.1007/s00284-9829-5]
- MERKEL, V., B. OHDER, M. BIELASZEWSKA, W. ZHANG, A. FRUTH, C. MENGE, E. BORRMANN, B. MIDDENDORF, J. MÜTHING, H. KARCH, AND A. MELLMANN. 2010. Distribution and Phylogeny of Immunoglobulin-Binding Protein G in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and its Association with Adherence Phenotypes. *Infect Immun* **78**:3625-2626.
- MERTENS, M., S.S. ESSBAUER, A. RANG, J. SCHRÖDER, W.D. SPLETTSTOESSER, C. KRETZSCHMAR, D.H. KRÜGER, M.H. GROSCHUP, K. MÄTZ-RENSING, AND R.G. ULRICH. 2010. Non-human primates in outdoor enclosures. Risk for infection with rodent-borne hantaviruses. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.018]
- METHNER, U., P.A. BARROW, AND A. BERNDT. 2010. Induction of a homologous and heterologous invasion – inhibitor effect after administration of *Salmonella* strains to newly hatched chicks. *Vaccine* **28**:6958-6963.
- METHNER, U., M. HELLER, AND H. BOCKLISCH. 2010. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis in a wild boar population in Germany. *Eur J Wildl Res* **56**:493-502.
- MEYER, U., A. SCHWABE, S. DÄNICKE, AND G. FLACHOWSKY. 2010. Effects of by-products from biofuel production on the performance of growing fattening bulls. *Anim Feed Sci Technol* **161**:132-139.
- MIEDANER, T., S. DÄNICKE, B. SCHMIEDCHEN, P. WILDE, H. WORTMANN, B.S. DHILLON, H.H. GEIGER, AND V. MIRDITA. 2010. Genetic variation for ergot (*Claviceps purpurea*) resistance and alkaloid concentrations in cytoplasmic-male sterile winter rye under pollen isolation. *Euphytica* **173**:299-306.
- MIETZE, A., D. MORICK, H. KÖHLER, S. HARRUS, C. DEHIO, I. NOLTE, AND R. GOETHE. 2010. Combined MLST and AFLP typing of *Bartonella henselae* isolated from cats reveals new sequence types and suggests clonal evolution. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetmic.2010.08.012]
- MIKSHOFSKY, H., H. SCHIRRMAYER, A. KATZEL, B. LEHMANN, AND I. BROER. 2010. Expression of truncated CTB::VP60 in tobacco exhibited no immunogenicity. *Plant Sci* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.plantsci.2010.08.013]

- MILLER, J., G. EISELE, G. TABATABAI, S. AULWURM, G. VON KÜRTHY, L. STITZ, P. ROTH, AND M. WELLER. 2010. Soluble CD70: a novel immunotherapeutic agent for experimental glioblastoma: Laboratory investigation. *J Neurosurg* **113**:280-285.
- MISCHKALE, K., I. REIMANN, J. ZEMKE, P. KÖNIG, AND M. BEER. 2010. Characterisation of a new infectious full-length cDNA clone of BVDV genotype 2 and generation of virus mutants. *Vet Microbiol* **142**:3-12.
- MÖHL, B., S. BÖTTCHER, H. GRANZOW, W. FUCHS, B.G. KLUPP, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Random Transposon-Mediated Mutagenesis of the Essential Large Tegument Protein pUL36 of Pseudorabies Virus. *J Virol* **84**:8153-8162.
- MONECKE, S., H. KANIG, W. RUDOLPH, E. MÜLLER, G. COOMBS, H. HOTZEL, P. SLICKERS, AND R. EHRICHT. 2010. Characterisation of Australian MRSA Strains ST75- and ST883-MRSA-IV and Analysis of Their Accessory Gene Regulator Locus. *PLoS ONE* **5**:e14025.
- MORÉ, G., L. PARDINI, W. BASSO, M. MACHUCA, D. BACIGALUPE, M.C. VILLANUEVA, G. SCHARES, M.C. VENTURINI, AND L. VENTURINI. 2010. Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. *Vet Parasitol* **169**:57-61.
- MÜHLDORFER, K., S. SCHWARZ, J. FICKEL, G. WIBBELT, AND S. SPECK. 2010. Genetic diversity of Pasteurella species isolated from European vespertilionid bats. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.002]
- MÜLLER, B., L.-M. DE KLERK-LORIST, M.M. HENTON, E. LANE, S. PARSONS, N.C. GEY VAN PITTIUS, A. KOTZE, P.D. VAN HELDEN, AND M. TANNER. 2010. Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.017]
- MÜLLER, T., B.G. KLUPP, C. FREULING, B. HOFFMANN, M. MOJCICZ, I. CAPUA, V. PALFI, B. TOMA, W. LUTZ, F. RUIZ-FON, C. GORTÁRZAR, A. HLINAK, U. SCHAARSCHMIDT, K. ZIMMER, F.J. CONRATHS, E.C. HAHN, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Characterization of pseudorabies virus of wild boar origin from Europe. *Epidemiol Infect* **138**:1590-1600.
- MUYRERS, J., R. KLINGENSTEIN, L. STITZ, AND C. KORTH. 2010. Structure-activity relationship of tocopherol derivatives suggesting a novel non-antioxidant mechanism in antiprion potency. *Neurosci Lett* **469**:122-126.
- NASEEM, S., J. MEENS, J. JORES, M. HELLER, S. DÜBEL, M. HUST, AND G. GERLACH. 2010. Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet Microbiol* **142**:285-292.
- NEGATSCH, A., H. GRANZOW, C. MARESCH, B.G. KLUPP, W. FUCHS, J.P. TEIFKE, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Ultrastructural Analysis of Virion Formation and Intraaxonal Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Primary Rat Neurons. *J Virol* **84**:13031-13035.
- NEGATSCH, A., T.C. METTENLEITER, AND W. FUCHS. 2010. Herpes simplex virus type 1 strain KOS carries a defective US9 and a mutated US8A gene. *J Gen Virol* [Epub ahead of print; doi:10.1099/vir.0.026484-0]
- NI, Y.-D., W.-J. HONG, Y.-C. ZHOU, R. GROSSMANN, AND R.-Q. ZHAO. 2010. Dual effects of daidzein on chicken hepatic vitellogenin II expression and estrogen receptor-mediated transactivation *in vitro*. *Steroids* **75**:245-251.
- NIELSEN, B.L., H.R. JUUL-MADSEN, S. STEENFELDT, J.B. KJAER, AND P. SØRENSEN. 2010. Feeding activity in groups of newly hatched broiler chicks: Effects of strain and hatching time. *Poultry Sci* **89**:1336-1344.
- NIEMANN, H., J.W. CARNWATH, D. HERRMANN, G. WIECZOREK, E. LEMME, A. LUCAS-HAHN, AND S. OLEK. 2010. DNA Methylation Patterns Reflect Epigenetic Reprogramming in Bovine Embryos. *Cell Reprog* **12**:33-42.
- NOUVION, A.-L., M. OUBAHA, S. LEBLANC, E.C. DAVIS, H. JASTROW, R. KAMMERER, V. BRETON, C. TURBIDE, S. ERGUN, J.-P. GRATTON, AND N. BEAUCHEMIN. 2010. CEACAM1: a key regulator of vascular permeability. *J Cell Sci* **123**:4221-4230.
- NOWAK-IMIALEK, M., W.A. KUES, B. PETERSEN, A. LUCAS-HAHN, D. HERRMANN, H.S. MEENA, M. OROPEZA, E. LEMME, H.R. SCHOLER, J.W. CARNWATH, AND H. NIEMANN. 2010. Oct4-EGFP transgenic pigs – a new large animal model for reprogramming studies. *Stem Cells Dev* [Epub ahead of print; doi:10.1089/scd.2010.0399]
- NOWAK-IMIALEK, M., W.A. KUES, C. RUDOLPH, B. SCHLEGELBERGER, U. TAYLOR, J.W. CARNWATH, AND H. NIEMANN. 2010. Preferential Loss of Porcine Chromosomes in Reprogrammed Interspecies Cell Hybrids. *Cell Reprog* **12**:55-65.
- OHASHI, K., F. TAKIZAWA, N. TOKUMARU, C. NAKAYASU, H. TODA, U. FISCHER, T. MORITOMO, K. HASHIMOTO, T. NAKANISHI, AND J.M. DIJKSTRA. 2010. A molecule in teleost fish, related with human MHC-encoded G6F, has a cytoplasmic tail with ITAM and marks the surface of thrombocytes and in some fishes also of erythrocytes. *Immunogenetics* **62**:543-559.
- OMMEH, S., L.N. JIN, H. EDING, F.C. MUCHADEYI, S. SULANDARI, M.S.A. ZEIN, G. DANBARO, C.E. WANI, S.G. ZHAO, Q.H. NIE, X.Q. ZHANG, M. NDILA, R. PREISINGER, G.H. CHEN, I.A. YOUSIF, K.-N. HEQ, S.J. OH, M. TAPIO, D. MASIGA, O. HANOTTE, H. JIANLIN, AND S. WEIGEND. 2010. Geographic and Breed Distribution Patterns of an A/G Polymorphism Present in the Mx Gene Suggests Balanced Selection in Village Chickens. *Int J Poultry Sci* **9**:32-38.
- ORBANZ, J. AND S. FINKE. 2010. Generation of recombinant European bat lyssavirus type 1 and inter-genotypic compatibility of lyssavirus genotype 1 and 5 antigenome promoters. *Arch Virol* **155**:1631-1641.
- PANTCHEV, A., R. STING, R. BAUERFEIND, J. TYCZKA, AND K. SACHSE. 2010. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **33**:473-484.

- PAVLOVA, S.P., J. VEITS, U. BLOHM, C. MARESCH, T.C. METTENLEITER, AND W. FUCHS. 2010. *In vitro* and *in vivo* characterization of glycoprotein C-deleted infectious laryngotracheitis virus. *J Gen Virol* **91**:847-857.
- PERRETEEN, V., K. KADLEC, S. SCHWARZ, U. GRÖNLUND ANDERSSON, M. FINN, C. GREKO, A. MOODLEY, S.A. KANIA, L.A. FRANK, D.A. BERNIS, A. FRANCO, M. IURESCIA, A. BATTISTI, B. DUIM, J.A. WAGENAAR, E. VAN DUJKEREN, J.S. WEESE, J.R. FITZGERALD, A. ROSSANO, L. GUARDABASSI. 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother* **65**:1145-1154.
- PETERS, A., P. LEBZIEN, U. MEYER, U. BORCHERT, M. BULANG, AND G. FLACHOWSKY. 2010. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and nutrient digestion in dairy cows. *Arch Anim Nutr* **64**:221-237.
- PETERS, M., J. KILWINSKI, P. WOHLSEIN, AND F.J. CONRATHS. 2010. Alveolar echinococcosis in a captive red-necked wallaby (*Macropus rufogriseus*). *Berl Münch Tierärztl Wschr* **123**:63-69.
- PHOGAT, J.B., AND N. PARVIZI. 2010. Involvement of opioids and catecholamines in stress modulation of LH secretion in the male pig. *Anim Reprod Sci* **121**:152-158.
- PICKEL, T., B. SCHOLZ, AND L. SCHRADER. 2010. Perch material and diameter affects particular perching behaviour in laying hens. *Appl Anim Behav Sci* **127**:37-42.
- PIEPER, J., U. METHNER, AND A. BERNDT. 2010. Characterization of avian gamma/delta T-cell subsets after *Salmonella* Typhimurium infection of chicks. *Infect Immun* [Epub ahead of print; doi:10.1128/IAI.00788-10]
- PITRA, C., S. SCHWARZ, AND J. FICKEL. 2010. Going west – invasion genetics of the alien raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* in Europe. *Eur J Wildl Res* **56**:117-129.
- POLAK, M.P., M. LARSKA, J.P.M. LANGEVELD, A. BUSCHMANN, M.H. GROSCHUP, AND J.F. ZMUDZINSKI. 2010. Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. *Vet J* **186**:47-52.
- POSTEL, A., T. LETZEL, S. FRISCHMANN, C. GRUND, M. BEER, AND T. HARDER. 2010. Evaluation of two commercial loop-mediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes. *J Vet Diagn Invest* **22**:61-66.
- PROBST, C., C. FREULING, I. MOSER, L. GEUE, H. KÖHLER, F.J. CONRATHS, H. HOTZEL, E.M. LIEBLER-TENORIO, AND M. KRAMER. 2010. Bovine tuberculosis: making a case for effective surveillance. *Epidemiol Infect* [Epub ahead of print; doi:10.1017/S0950268810000786]
- QANBARI, S., M. HANSEN, S. WEIGEND, R. PREISINGER, AND H. SIMIANER. 2010. Linkage disequilibrium reveals different demographic history in egg laying chickens. *BMC Genet* **11**:103.
- RADTKE, K., D. KIENEKE, A. WOLFSTEIN, K. MICHAEL, W. STEFFEN, T. SCHOLZ, A. KARGER, AND B. SODEIK. 2010. Plus- and Minus-End Directed Microtubule Motors Bind Simultaneously to Herpes Simplex Virus Capsids Using Different Inner Tegument Structures. *PLoS Pathogens* **6**:e1000991.
- RADUN, D., H. BERNARD, M. ALTMANN, I. SCHÖNEBERG, V. BOCHAT, U. VAN TREECK, R.M. RIPPE, R. GRUNOW, M. ELSCHNER, W. BIEDERBICK, AND G. KRAUSE. 2010. Preliminary case report of fatal anthrax in an injecting drug user in North-Rhine-Westphalia, Germany, December 2009. *Eurosurveillance* **15**:5.
- RAGALLER, V., P. LEBZIEN, W. BIGALKE, K.-H. SÜDEKUM, L. HÜTHER, AND G. FLACHOWSKY. 2010. Effects of folic acid supplementation to rations differing in the concentrate to roughage ratio on ruminal fermentation, nutrient flow at the duodenum, and on serum and milk variables of dairy cows. *Arch Anim Nutr* **64**:484-503.
- RAGALLER, V., P. LEBZIEN, W. BIGALKE, K.-H. SÜDEKUM, L. HÜTHER, AND G. FLACHOWSKY. 2010. Effects of a pantothenic acid supplementation to different rations on ruminal fermentation, nutrient flow at the duodenum, and on blood and milk variables of dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr* [Epub ahead of print; doi:10.1111/j.1439-0396.2010.01103.x]
- RAGALLER, V., P. LEBZIEN, K.-H. SÜDEKUM, L. HÜTHER, AND G. FLACHOWSKY. 2010. Pantothenic acid in ruminant nutrition: a review. *J Anim Physiol Anim Nutr* [Epub ahead of print; doi:10.1111/j.1439-0396.2010.01004.x]
- RAMNIAL, V., R. KOSMIDER, O. AYLAN, C. FREULING, T. MÜLLER, AND A.R. FOOKS. 2010. Quantitative risk assessment to compare the risk of rabies entering the UK from Turkey via quarantine, the Pet Travel Scheme and the EU Pet Movement Policy. *Epidemiol Infect* **138**:1114-1125.
- RAMP, K., M. SKIBA, A. KARGER, T.C. METTENLEITER, AND A. RÖMER-OBERDÖRFER. 2011. Influence of insertion site of the avian influenza virus haemagglutinin (HA) gene within the Newcastle disease virus genome on HA expression. *J Gen Virol* [Epub ahead of print; doi: 10.1099/vir.0.027268-0].
- RASMUSSEN, T.B., I. REIMANN, Å. UTTENTHAL, I. LEIFER, K. DEPNER, H. SCHIRRMIEIER, AND M. BEER. 2010. Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy. *Vet Microbiol* **142**:13-17.
- REBL, A., B. KÖLLNER, E. ANDERS, K. WIMMERS, AND T. GOLDAMMER. 2010. Peptidylarginine deiminase gene is differentially expressed in freshwater and brackish water rainbow trout. *Mol Biol Rep* **37**:2333-2339.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., D.S. BURKE, C.H. CALISHER, R.G. DIETZGEN, C.M. FAUQUET, S.A. GHABRIAL, P.B. JAHRLING, K.M. JOHNSON, M.R. HOLBROOK, M.C. HORZINEK, G.M. KEIL, J.H. KUHN, B.W.J. MAHY, G.P. MARTELLI, C. PRINGLE, E.P. RYBICKI, T. SKERN, R.B. TESH, V. WAHL-JENSEN, P.J. WALKER, AND S.C. WEAVER. 2010. A proposal to change existing virus species names to non-Latinized binomials. *Arch Virol* **155**:1909-1919.
- REIMANN, I., K. DEPNER, K. UTKE, I. LEIFER, E. LANGE, AND M. BEER. 2010. Characterization of a new chimeric marker vaccine candidate with a mutated antigenic E2-epitope. *Vet Microbiol* **142**:45-50.
- REINHOLD, P., H. HARTMANN, AND P. D. CONSTABLE. 2009. Characterisation of acid-base abnormalities in pigs experimentally infected with *Chlamydia suis*. *Vet J* **184**:212-218.

- REINHOLD, P., AND H. KNOBLOCH. 2010. Exhaled breath condensate: lessons learned from veterinary medicine. *J Breath Res* **4**.
- REINHOLD, P., E. LIEBLER-TENORIO, S. SATTLER, AND K. SACHSE. 2010. Recurrence of *Chlamydia suis* infection in pigs after short-term antimicrobial treatment. *Vet J* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.tvjl.2010.01.008]
- REINHOLD, P., K. SACHSE, AND B. KALTENBROECK. 2010. *Chlamydiaceae* in cattle: Commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet J* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.tvjl.2010.00.003]
- REVAY, T., C. KOPP, A. FLYCKT, J. TAPONEN, R. IJÁS, S. NAGY, A. KOVACS, W. RENS, D. RATH, A. HIDAS, J.F. TAYLOR, AND M. ANDERSSON. 2010. Diploid spermatozoa caused by failure of the second meiotic division in a bull. *Theriogenology* **73**:421-428.
- RICHTER, P., C. UMBREIT, M. FRANZ, A. BERNDT, S. GRIMM, A. UECKER, F.D. BÖHMER, H. KOSMEHL, AND A. BERNDT. 2010. EGF/TGF I co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332. *J Oral Pathol Med* [Epub ahead of print; doi: 10.1111/j.600-0714.2010.00936x]
- RIEDER, M., K. BRZÓZKA, C.K. PFALLER, J.H. COX, L. STITZ, AND K.-H. CONZELMANN. 2010. Genetic dissection of interferon antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity. *J Virol* [Epub ahead of print; doi:10.1128/JVI.01427-10]
- RIEHM, J.M., L. RAHALISON, H.C. SCHOLZ, B. THOMA, M. PFEFFER, L.M. RAZANAKOTO, S. AL DAHOUK, H. NEUBAUER, AND H. TOMASO. 2010. Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. *Mol Cell Probes* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.mcp.2010.09.002]
- RÖNCHEN, S., B. SCHOLZ, H. HAMANN, AND O. DISTL. 2010. Use of functional areas, perch acceptance and selected behavioural traits in three different layer strains kept in furnished cages, small group systems and modified small group systems with elevated perches. *Arch Geflügelk* **74**:256-264.
- VAN ROOIJ, E.M.A., F.A.M. RIJSEWIJK, H.W. MOONEN-LEUSEN, A.T.J. BIANCHI, AND H.-J. RZIHA. 2010. Comparison of different prime-boost regimes with DNA and recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs. *Vaccine* **28**:1808-1813.
- ROOST, H., M. SEELMANN, M. KONOW, M. KLOPRIES, F. MELZER, R. WOLK, M. KAY, E. DEY, H. MILDNER, AND H. HEYNE. 2010. Early recognition and monitoring of brucellosis in free-range pig farms in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *Tierärztl Umschau* **65**:278-284.
- ROSE, M.K., AND N. PARVIZI. 2010. Up-regulation of lymphocytic growth hormone secretion during the luteal phase of cycle and early pregnancy. *Regul Pept* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.regpep.2010.11.001]
- ROSTAHER, A., R.S. MUELLER, M. MAJZOUB, G. SCHARS, AND N.S. GOLLNICK. 2010. Bovine besnoitiosis in Germany. *Vet Dermatol* **21**:329-334.
- RUBBENSTROTH, D., H. HOTZEL, J. KNOBLOCH, L. TESKE, S. RAUTENSCHLEIN, AND M. RYLL. 2010. Isolation and characterization of atypical *Riemerella columbina* strains from pigeons and their differentiation from *Riemerella anatipestifer*. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.008].
- RUDOLF, M., M. PÖPPEL, A. FRÖHLICH, A. BREITHAUPT, J. TEIFKE, U. BLOHM, T. METTENLEITER, M. BEER, AND T. HARDER. 2010. Longitudinal 2 years field study of conventional vaccination against highly pathogenic avian influenza H5N1 in layer hens. *Vaccine* **28**:6832-6840.
- RUETTGER, A., J. FEIGE, P. SLICKERS, E. SCHUBERT, S.A. MORRÉ, Y. PANNEKOEK, B. HERRMANN, H.J.C. DE VRIES, R. EHRLICH, AND K. SACHSE. 2010. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains from culture and clinical samples using an *ompA*-based DNA microarray assay. *Mol Cell Probes* [Epub ahead of print; doi: 10.1016/j.mcp.2010.09.004]
- RUETTGER, A., S. NEUMANN, B. WIEDERANDERS, AND R. HUBER. 2010. Comparison of different methods for preparation and characterization of total RNA from cartilage samples to uncover osteoarthritis *in vivo*. *BMC Res Notes* **3**:7.
- SACHSE, K., H.S.H. SALAM, R. DILLER, E. SCHUBERT, B. HOFFMANN, AND H. HOTZEL. 2010. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet J* **186**:299-303.
- SAMMIN, D., E. RYAN, N.P. FERRIS, D.P. KING, S. ZIENTARA, B. HAAS, H. YADIN, S. ALEXANDERSEN, K. SUMPTION, AND D.J. PATON. 2010. Options for Decentralized Testing of Suspected Secondary Outbreaks of Foot-and-mouth Disease. *Transbound Emerg Dis* **57**:237-243.
- SANTOS DE AZEVEDO, S., H.F. DE JESUS PENA, C.J. ALVES, A.A. DE MELO GUIMARÃES FILHO, R.M. OLIVEIRA, P. MAKSIMOV, G. SCHARS, AND S.M. GENNARI. 2010. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* **19**:1-5.
- SCHARS, G., W. BASSO, M. MAJZOUB, A. ROSTAHER, J.C. SCHARR, M.C. LANGENMAYER, J. SELMAIR, J.P. DUBEY, H.C. CORTES, F.J. CONRATHS, AND N.S. GOLLNICK. 2010. Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Vet Parasitol* **171**:32-40.
- SCHARS, G., W. BASSO, M. MAJZOUB, A. ROSTAHER, J.C. SCHARR, M.C. LANGENMAYER, J. SELMAIR, J.P. DUBEY, H.C. CORTES, F.J. CONRATHS, T. HAUPT, M. PÜRRO, A. RAEBER, P. BUHOLZER, AND N.S. GOLLNICK. 2010. Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Vet Parasitol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetpar.2010.09.024]
- SCHMIDT-CHANASIT, J., A. BIALONSKI, P. HEINEMANN, R.G. ULRICH, S. GÜNTHER, H.F. RABENAU, AND H.-W. DOERR. 2010. A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany. *J Clin Virol* **48**:208-211.

- SCHMIDT-CHANASIT, J., S. ESSBAUER, R. PETRAITYTE, K. YOSHIMATSU, K. TACKMANN, F.J. CONRATHS, K. SASNAUSKAS, J. ARIKAWA, A. THOMAS, M. PFEFFER, J.J. SCHARNINGHAUSEN, W. SPLETTSTOESSER, M. WENK, G. HECKEL, AND R.G. ULRICH. 2010. Extensive host sharing of central European Tula virus. *J Virol* **84**:459-474.
- SCHOLTZ, N.D., I. HALLE, S. DÄNICKE, G. HARTMANN, B. ZUR, AND H. SAUERWEIN. 2010. Effects of an active immunization on the immune response of laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) fed with or without genetically modified *Bacillus thuringiensis*-maize. *Poultry Sci* **89**:1122-1128.
- SCHOLZ, B., S. URSELMANS, J.B. KJAER, AND L. SCHRADER. 2010. Food, wood, or plastic as substrates for dustbathing and foraging in laying hens: A preference test. *Poultry Sci* **89**:1584-1589.
- SCHREY, C., A.T.A. WEISS, P. OLIAS, K. HENNING, E. SCHEIN, AND C.F. FREY. 2010. *Trichomonas*-assoziierte Enteritis bei einem Hundewelpen mit Parvovirose. *Tierärztl Prax* **38K**:325-327.
- SCHULZE, C., A. HLINAK, P. WOHLSEIN, P. KUTZER, AND T. MÜLLER. 2010. Spontaneous Aujeszky's disease (pseudorabies) in European wild boars (*Sus scrofa*) in the federal state of Brandenburg, Germany. *Berl Münch Tierärztl Wschr* **123**:359-364.
- SCHWABE, A., U. MEYER, G. FLACHOWSKY, AND S. DÄNICKE. 2010. Effect of graded levels of rare earth elements in diets of fattening bulls on growing and slaughtering performance, and on nutrient digestibility of wethers. *Arch Anim Nutr* [Epub ahead of print; doi:10.1080/1745039X.2010.520408]
- SCHWARZ, S., P. SILLEY, S. SIMJEE, N. WOODFORD, E. VAN DUJKEREN, A.P. JOHNSON, AND W. GAASTRA. 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol* **141**:1-4.
- SCHWARZ, S., P. SILLEY, S. SIMJEE, N. WOODFORD, E. VAN DUJKEREN, A.P. JOHNSON, AND W. GAASTRA. 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* **65**:601-604.
- SCHWIND, K.-H., S. DÄNICKE, AND W. JIRA. 2010. Survey of dioxins, dioxin-like PCBs and marker PCBs in German feeds of plant origin. *J Verbr Lebensm* **5**:413-420.
- SEIDOWSKI, D., U. ZIEGLER, J.A.C. VON RÖNN, K. MÜLLER, K. HÜPPOP, T. MÜLLER, C. FREULING, R.-U. MÜHLE, N. NOWOTNY, R.G. ULRICH, M. NIEDRIG, AND M.H. GROSCUP. 2010. West Nile Virus Monitoring of Migratory and Resident Birds in Germany. *Vector-Borne Zoon Dis* **10**:639-647.
- SEITZ, C., T. FRENSING, D. HÖPER, G. KOCHS, AND U. REICHL. 2010. High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J Gen Virol* **91**:1754-1763.
- SHORE, A.C., O.M. BRENNAN, R. EHRICHT, S. MONECKE, S. SCHWARZ, P. SLICKERS, AND D.C. COLEMAN. 2010. Identification and Characterization of the Multidrug Resistance Gene *cfr* in a Pantone-Valentine Leukocidin-Positive Sequence Type 8 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:4978-4984.
- SINGER, B.B., I. SCHEFFRAHN, R. KAMMERER, N. SUTTORP, S. ERGUN, AND H. SLEVOGT. 2010. Deregulation of the CEACAM Expression Pattern Causes Undifferentiated Cell Growth in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *PLoS ONE* **5**:e8747.
- SIROTKIN, A.V., A.V. MAKAREVICH, AND R. GROSMMANN. 2010. Protein Kinases and Ovarian Functions. *J Cell Physiol* [Epub ahead of print; doi: 10.1002/jcp.22364].
- SKIBA, M., F. GLOWINSKI, D. KOCZAN, T.C. METTENLEITER, AND A. KARGER. 2010. Gene expression profiling of Pseudorabies virus (PrV) infected bovine cells by combination of transcript analysis and quantitative proteomic techniques. *Vet Microbiol* **143**:14-20.
- SPOLDERS, M., H. GRABHERR, G. FLACHOWSKY, S. DÄNICKE, AND M. FÜRL. 2010. Zeolith A – eine wirksame Alternative zur Prophylaxe der Gebärpause. *Tierärztl Umschau* **65**:271-276.
- SPOLDERS, M., M. HÖLTERSINKEN, U. MEYER, J. REHAGE, AND G. FLACHOWSKY. 2010. Assessment of Reference Values for Copper and Zinc in Blood Serum of First and Second Lactating Dairy Cows. *Vet Med Int* [Epub ahead of print; doi:10.4061/2010/194656]
- SPOLDERS, M., S. ÖHLSCHLÄGER, J. REHAGE, AND G. FLACHOWSKY. 2010. Inter- and intra-individual differences in serum copper and zinc concentrations after feeding different amounts of copper and zinc over two lactations. *J Anim Physiol Anim Nutr* **94**:162-173.
- STÄHL, K., M. BEER, H. SCHIRRMIEIER, B. HOFFMANN, S. BELÁK, AND S. ALENIUS. 2010. Atypical 'HoBi'-like pestiviruses – Recent findings and implications thereof. *Vet Microbiol* **142**:90-93.
- STARKE, A., A. HAUDUM, R. BUSCHE, M. BEYERBACH, S. DÄNICKE, AND J. REHAGE. 2010. Technical note: Analysis of total lipid and triacylglycerol content in small liver biopsy samples in cattle. *J Anim Sci* **88**:2741-2750.
- STECH, J. 2010. Several hemagglutinins of same serotype for induction of broad immunity against influenza A virus antigenic drift variants: WO2008048984. *Exp Opin Ther Patents* **20**:447-450.
- STECH, J., M. BEER, T. VAHLENKAMP, AND T. HARDER. Das pandemische H1N1-Influenzavirus/2009. *Bundesgesundheitsbl* **53**:1231-1237.
- STÖCKEL, S., W. SCHUMACHER, S. MEISEL, M. ELSCHNER, P. RÖSCH, AND J. POPP. 2010. Raman Spectroscopy-Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores. *Appl Environ Microbiol* **76**:2895-2907.
- STRELAU, K.K., A. BRINKER, C. SCHNEE, K. WEBER, R. MÖLLER, AND J. POPP. 2010. Detection of PCR products amplified from DNA of epizootic pathogens using magnetic nanoparticles and SERS. *J Raman Spectrosc* [Epub ahead of print; doi:10.1002/jrs.2730]
- SUTOR, A., K. KAUALA, AND K. ANSORGE. 2010. Diet of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) – a canid with an opportunistic foraging strategy. *Acta Theriol* **55**:165-176.

- TAYLOR, U., S. KLEIN, S. PETERSEN, W. KUES, S. BARCIKOWSKI, AND D. RATH. 2010. Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged gold nanoparticles. *Cytometry Part A* **77**:439-446.
- THALWITZER, S., B. WACHTER, N. ROBERT, G. WIBBELT, T. MÜLLER, J. LONZER, M.L. MELI, G. BAY, H. HOFER, AND H. LUTZ. 2010. Seroprevalences to Viral Pathogens in Free-Ranging and Captive Cheetahs (*Acinonyx jubatus*) on Namibian Farmland. *Clin Vacc Immunol* **17**:232-238.
- TOMASO, H., M. KATTAR, M. EICKHOFF, U. WERNERY, S. AL DAHOUK, E. STRAUBE, H. NEUBAUER, AND H.C. SCHOLZ. 2010. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of *Brucellae* in tissue using quantitative real-time PCR. *BMC Infect Dis* **10**:100.
- TROJNAR, E., P. OTTO, B. ROTH, J. REETZ, AND R. JOHNE. 2010. The genome segments of group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins. *J Virol* **84**:10254-10265.
- TURCITU, M.A., G. BARBOI, V. VUTA, I. MIHAI, D. BONCEA, F. DUMITRESCU, M.D. CODREANU, N. JOHNSON, A.R. FOOKS, T. MÜLLER, AND C.M. FREULING. 2010. Molecular epidemiology of rabies in Romania provides evidence for a high degree of heterogeneity and virus diversity. *Virus Res* **150**:28-33.
- ULFERTS, R., T.C. METTENLEITER, J. ZIEBUHR. 2010. Characterization of bafinivirus main protease autoprocessing activities. *J Virol* [Epub ahead of print; doi:10.1127/JVI.01716-10]
- UTTENTHAL, Å., S. PARIDA, T.B. RASMUSSEN, D.J. PATON, B. HAAS, AND W.G. DUNDON. 2010. Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. *Exp Rev Vacc* **9**:73-87.
- VAHLENKAMP, T.W., J.P. TEIFKE, T.C. HARDER, M. BEER, AND T.C. METTENLEITER. 2010. Systemic influenza virus H5N1 infection in cats after gastrointestinal exposure. *Influenza Other Resp Viruses* **4**:379-386.
- VELAZQUEZ, M.A., D. HERRMANN, W.A. KUES, AND H. NIEMANN. 2010. Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with down-regulation of the IGF1 receptor. *Reproduction* [Epub ahead of print; doi:10.1530/REP-10-0336]
- VELAZQUEZ, M.A., I. PARRILLA, A. VAN SOOM, S. VERBERCKMOES, W. KUES, AND H. NIEMANN. 2010. Sampling techniques for oviductal and uterine luminal fluid in cattle. *Theriogenology* **73**:758-767.
- VERLEIH, M., A. REBL, B. KÖLLNER, T. KORYTÁR, G. KOTTERBA, E. ANDERS, K. WIMMERS, AND T. GOLDAMMER. 2010. Molecular characterization of PRR13 and its tissue-specific expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* **36**:1271-1276.
- VETTER, J.M., L. FRISCH, C. DROSTEN, R.S. ROSS, M. ROGGENDORF, B. WOLTERS, T. MÜLLER, H.B. DICK, AND N. PFEIFFER. 2010. Survival After Transplantation of Corneas From a Rabies-Infected Donor. *Cornea* [Epub ahead of print; doi: 10.1097/ICO.0b013e3181e4572a]
- VOGEL, A.B., E. HAASBACH, S.J. REILING, K. DROEBNER, K. KLINGEL, AND O. PLANZ. 2010. Highly Pathogenic Influenza Virus Infection of the Thymus Interferes with T Lymphocyte Development. *J Immunol* **185**:4824-4834.
- VOGES, M., V. BACHMANN, R. KAMMERER, U. GOPHNA, AND C.R. HAUCK. 2010. CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. *BMC Microbiol* **10**:117.
- VOS, A.C., T. MÜLLER, L. NEUBERT, AND C.C. VOIGT. 2010. Validation of a less invasive blood sampling technique in rabies serology using *Reduviid* bugs (*Triatominae*, *Hemiptera*). *J Zoo Wildl Med* **41**:63-68.
- WÄCKERLIN, R., M. ESCHBAUMER, P. KÖNIG, B. HOFFMANN, AND M. BEER. 2010. Evaluation of humoral response and protective efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 one year after vaccination of sheep and cattle. *Vaccine* **28**:4348-4355.
- WAGNER, J., A. KNEUCKER, E. LIEBLER-TENORIO, V. FACHINGER, M. GLASER, S. PESCH, M.P. MURTAUGH, AND P. REINHOLD. 2010. Respiratory function and pulmonary lesions in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet J* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.tvj.2009.12.022]
- WEI, X.J., Y.D. NI, L.Z. LU, R. GROSSMANN, AND R.Q. ZHAO. 2010. The effect of equol injection in ovo on posthatch growth, meat quality and antioxidation in broilers. *Animal* [Epub ahead of print; doi:10.1017/S1751731110001771]
- WEIGOLDT, M., J. MEENS, K. DOLL, I. FRITSCH, P. MÖBIUS, R. GOETHE, AND G.F. GERLACH. 2010. Differential proteome analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* grown *in vitro* and isolated from cases of clinical Johne's disease. *Microbiology* [Epub ahead of print; doi:10.1099/mic.0.044859-0].
- WYSOCKI, M., W. BESSEI, J.B. KJAER, AND J. BENNEWITZ. 2010. Genetic and physiological factors influencing feather pecking in chickens. *World Poultry Sci J* **66**:659-671.
- YUNUS, A.W., H. VALENTA, S.M. ABDEL-RAHEEM, S. DÖLL, S. DÄNICKE, AND J. BÖHM. 2010. Blood plasma levels of deoxynivalenol and its de-epoxy metabolite in broilers after a single oral dose of the toxin. *Mycotox Res* **26**:217-220.
- ZARAZA, J., A. OROPEZA, M.A. VELAZQUEZ, K. KORSAAWE, D. HERRMANN, J.W. CARNWATH, AND H. NIEMANN. 2010. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation *in vitro*-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. *Theriogenology* **74**:75-89.
- ZEMKE, J., P. KÖNIG, K. MISCHKALE, I. REIMANN, AND M. BEER. 2010. Novel BVDV-2 mutants as new candidates for modified-live vaccines. *Vet Microbiol* **142**:69-80.
- ZIEGLER, U., D. SEIDOWSKI, A. GLOBIG, S.R. FERREIDOUNI, R.G. ULRICH, M.H. GROSCHUP. 2010. Sentinel birds in wild-bird resting sites as potential indicators for West Nile virus infections in Germany. *Arch Virol* **155**:965-969.

ZIELECKI, F., I. SEMMLER, D. KALTHOFF, D. VOSS, S. MAUEL, A.D. GRUBER, M. BEER, AND T. WOLFF. 2010. Virulence Determinants of Avian H5N1 Influenza A Virus in Mammalian and Avian Hosts: Role of the C-Terminal ESEV Motif in the Viral NS1 Protein. *J Virol* **84**:10708-10718.

2.2 WEITERE WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

ABDELWAHAB, E.M., H.M. HAFEZ, M.M. ALY, C. GRUND, AND T.C. HARDER. 2010. Increasing Prevalence of Unique Mutation Patterns in H5N1 Avian Influenza Virus HA and NA Glycoproteins from Human Infections in Egypt. Sequencing 2010, Article ID 450823 [Epub; doi:10.1155/2010/450823]

ACHILLES, B., I. SEMMLER, G. BENNINGER, AND A. WIETHÖLTER. 2010. Zoonosen auf dem Vormarsch – Forscher bündeln ihre Kräfte. *DZKF* **1/2-2010**:55-58.

ACHILLES, W., I. BENDA, E. VON BORELL, W. PFLANZ, M. SCHICK, L. SCHRADER, AND R. WEBER. 2010. Beschäftigungsmöglichkeiten für Schweine: Lösungen – Bewertungen – Kosten. *KTBL-Heft* **87**:1-45.

BERK, A. AND U. ABRAHAM. 2010. Einsatz eines Gemisches einheimischer Körnerleguminosen, hydrothermisch behandelt oder unbehandelt in der Fütterung von Absatzferkeln in der Ökologischen Schweinehaltung. *In: Gierus, M., H. Kluth, M. Bulang, and H. Kluge (Hrsg.): 11. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 23.-25. November 2010, Lutherstadt Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-250-3, S. 12-14.*

BERK, A. AND F. WEISSMANN. 2010. Bilanzversuche zur Ermittlung des kompensatorischen Wachstums in der Schweinemast. *Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung* 24./25.03.2010, S. 172-175.

BERK, J. 2010. Pododermatitis bei Masthühnern und Mastputen. *In: DVG, Tagung der Fachgruppen „Tierschutz“ und „Versuchstierkunde“ in Verbindung mit der Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen, GV-Solas und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz, Verlag der DVG Service GmbH, ISBN: 978-3-941703-59-9, S. 114-122.*

BERK, J. 2010. Alternative Wege gegen Federpicken. *DGS Magazin* 31/2010:26-30.

BERK, J. 2010. Einstreuart beachten. *BauernZeitung*, 39. Woche 2010, S. 44-45.

BERK, J. 2010. Fußballveränderungen bei Mastputen. *In: 4. Süddeutscher Putentag, LAF-Tagung, Satteldorf, 3.12.2010, S. 26-29.*

BERK, J. AND J. DANNENBRINK. 2010. Anrechenbarkeit der Nutzfläche eines Außenklimabereiches auf die Erhöhung der Besatzdichte in der Putenmast. *In: DVG, Tagung der Fachgruppen „Tierschutz“ und „Versuchstierkunde“ in Verbindung mit der Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen, GV-Solas und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz, Verlag der DVG Service GmbH, ISBN: 978-3-941703-59-9, S. 262-268.*

BERK, J. AND G. HAHN. 2010. Effect of walking exercise on performance, bone density and carcass quality in male turkeys. *In: Proceedings of the XIIIth European Poultry Conference, Tours, France, 23rd-27th August 2010, S26-Poultry Welfare, CD Rom EISSN no. 1743-4777.*

BERK, J. AND T. HINZ. 2010. Effect of litter type on health, performance and air quality in a forced ventilated turkey house. *In: Proceedings of the 8th International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, 27th-29th May 2010, ISBN: 978-3-86664-872-2, S. 43-50.*

BINDER, A., J.P. TEIFKE, G.A. SATURDAY, B. HOFFMANN, C. FREULING, T. MÜLLER, AND S. SAUER. 2010. Tollwut – Entwicklung einsatzorientierter Diagnoseverfahren. *Wehrmed Mschr* **54**:290-292.

BOCKLISCH, H., W.-I. BOCK, AND U. METHNER. 2010. Wildschweinkrankheiten unter besonderer Berücksichtigung der Salmonellose. *Beitr Jagd Wildforsch* **35**:201-207.

CLIQUE, F., C. FREULING, M. SMRECAK, W.H.M. VAN DER POEL, D. HORTON, A.R. FOOKS, E. ROBARDET, E. PICARD-MEYER, AND T. MÜLLER. 2010. Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the European Union. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/67e.htm>

CONRATHS, F.J. 2010. Globalisierung und Klimawandel – Steigendes Risiko für "exotische" Tierseuchen in Deutschland. *Hundkatzeperd* 01/10, S. 6-8.

CONRATHS, F.J., H. BERNARD, K. HENNING, M. KRAMER, AND H. NEUBAUER. 2010. Q-Fieber: Zur aktuellen Situation in Deutschland und den Niederlanden. *Tierärztl Umschau* **65**:152-159.

CONRATHS, F.J., J.M. GETHMANN, B. HOFFMANN, M. BEER, M. KRAMER, AND C. STAUBACH. 2010. Impact of Climate Change on Orbivirus Infection. *Nova Act Leopold* **NF111**:93-98.

DÄNICKE, S. 2010. Undesirable substances in ruminant nutrition – The bright and the dark side of the rumen. *In: 23. Hülsenberger Gespräche 2010, 02.-04.06.2010, Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hei gener Europrint, Hamburg, S. 94-101.*

DÖLL, S., D. ROHWEDER, B. BROSIG, AND S. DÄNICKE. 2010. Zur Wirkung von Deoxynivalenol (DON) und Fischöl im Futter für Mastschweine auf die Leistung und das Futteraufnahmeverhalten. *In: Gierus, M., H. Kluth, M. Bulang, and H. Kluge (Hrsg.): 11. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 23.-25. November 2010, Lutherstadt Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-250-3, S. 101-103.*

- DREMSEK, P., A. SCHIELKE, M. EIDEN, M.H. GROSCHUP, B. APPEL, R. JOHNE, AND R.G. ULRICH. 2010. Hepatitis E in Deutschland – Herausforderungen an die veterinärmedizinische Forschung? – Teil 1. Rdsch Fleischhyg Lebensmittelueberw **6/2010**:212-215.
- DUERRWALD, R., A. KRUMBHOLZ, S. BAUMGARTE, M. SCHLEGEL, T.W. VAHLENKAMP, H.-J. SELBITZ, P. WUTZLER, AND R. ZELL. 2010. Swine influenza A vaccines, pandemic (H1N1) 2009 virus, and cross-reactivity. *Emerg Infect Dis* **16**:1029-1030.
- EISMANN, A., T. EWRINGMANN, F. JUST, T. MÜLLER, AND C. FREULING. 2010. Rabies in Bavaria (Germany) in an imported puppy from Bosnia-Herzegovina. *Rabies Bull Eur* **34**:5-6.
- ESSBAUER, S., S. SCHEX, C. KLINC, B. VON WISSMANN, W. HAUTMANN, J. JACOB, M. FABER, K. STARK, J. SCHMIDT-CHANASIT, D.H. KRÜGER, R.G. ULRICH, AND C. TRIEBENBACHER. 2010. Starker Anstieg von Hantavirus-Infektionen. *LWF aktuell* **77**:52-53.
- FLACHOWSKY, G. 2010. Wiederkäuer – Integraler Bestandteil der zukünftigen Ernährungssicherung und des Klimaschutzes. *In*: 23. Hülsenberger Gespräche 2010, 02.-04.06.2010, Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Heigener Europrint, Hamburg, S. 10-23.
- FLACHOWSKY, G. 2010. Notwendigkeit – Wissensstand – Einflussfaktoren Carbon (CO₂)-Footprints für Milch, Teil I. *Molkerei-Industrie* **01/2010**:24-28.
- FLACHOWSKY, G. 2010. Notwendigkeit – Wissensstand – Einflussfaktoren Carbon (CO₂)-Footprints für Milch, Teil II. *Molkerei-Industrie* **02/2010**:29-30.
- FLACHOWSKY, G. 2010. Animal Nutrition in the 21st Century – Quo vadis? Proceedings of the International Seminar on Sustainable Development for Feed, Biomass Energy and Livelihood Security from 18-20 Nov. 2007. *AGROBIOS (INTERNATIONAL)*, S. 261-287.
- FLACHOWSKY, G. 2010. Globale Ernährungssicherung: Land in Sicht? *NovoArgumente* 105:64-68.
- FLACHOWSKY, G. 2010. Futtermittel aus gentechnisch veränderten Pflanzen der zweiten Generation – Gegenwärtige Situation und ernährungsphysiologische Bewertung. *In*: Gierus, M., H. Kluth, M. Bulang, and H. Kluge (Hrsg.): 11. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 23.-25. November 2010, Lutherstadt Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-250-3, S. 1-8.
- FLACHOWSKY, G. AND S. DÄNICKE. 2010. Lebensmittel liefernde Tiere als "Mittäter" und "Opfer" von Klimaveränderungen. *Ländlicher Raum, Agrarsoziale Gesellschaft e.V.* **61(03)**:44-45.
- FLACHOWSKY, G., S. DÄNICKE, AND U. MEYER. 2010. Konjugierte Linolsäuren (CLA) in der Milchkuhfütterung. *REKASAN-Journal* **17**:11-13.
- FLACHOWSKY, G., U. MEYER, A. BERK, AND F. HACKELSPERGER. 2010. Konzentrationen und Transfer verschiedener Futterinhaltsstoffe in Lebensmittel tierischer Herkunft. *REKASAN-Journal* **17**:56-59.
- FREULING, C., T. SELHORST, H.-J. BÄTZA, S. ROSS, AND T. MÜLLER. 2010. Tollwut und Tollwutfreiheit in Deutschland. *In*: I. Verwuert, J.R. Aschenbach, G. Gäbel, A. Dausgshies (Hrsg.), Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress, Leipziger Universitätsverlag GmbH, ISBN: 978-3-86583-442-3, S. 420-425.
- GENTILE, A., G. MILITERNO, P. BASSI, G. SCHARÉS, M. MAJZOUB, AND N.S. GOLLNICK. 2010. Su di un episodio di besnoitiosi bovina in Italia. *Buiatria – Journal of the Italian Association for Buiatrics* **5**:3-15.
- GETHMANN, J., B. HOFFMANN, C. PROBST, M. BEER, F.J. CONRATHS, T.C. METTENLEITER. 2010. Drei Jahre Blauzungenkrankheit Serotyp 8 in Deutschland – ein Überblick. *Tierärztl Umschau* **65**:4-12.
- GOLLNICK, N.S., A. GENTILE, AND G. SCHARÉS. 2010. Diagnosis of bovine besnoitiosis in a bull born in Italy. *Vet Rec* **166**:599.
- GOLLNICK, N.S., W. KLEE, M. MAJZOUB, A. ROSTAHER, B. BAUER, W. BASSO, F.J. CONRATHS, AND G. SCHARÉS. 2010. *Besnoitia besnoiti*: Über das Risiko der Ausbreitung in Deutschland. *Dt Tierärztebl* **58**:338-341.
- GOLLNICK, N.S., W. KLEE, A. ROSTAHER, M. MAJZOUB, J. SELMAIER, W. BASSO, AND G. SCHARÉS. 2010. Die leise Bedrohung: Bovine Besnoitiose in Deutschland. *Klauentierpraxis* **18**:41-45.
- GOLLNICK, N.S., W. KLEE, J.C. SCHARR, M.C. LANGENMAYER, M. MAJZOUB, A. ROSTAHER, W. BASSO, F.J. CONRATHS, AND G. SCHARÉS. 2010. *Besnoitia besnoiti* auf der Spur. *Dt Tierärztebl* **58**:482-490.
- GOLLNICK, N.S., A. ROSTAHER, A. GENTILE, J.C. SCHARR, M.C. LANGENMAYER, M. MAJZOUB, W. BASSO, F.J. CONRATHS, AND G. SCHARÉS. 2010. Bovine Besnoitiosis – An Emerging Disease. *Cattle Pract* **18**:151-152.
- GROENEVELD, E. AND H. LICHTENBERG. 2010. PopRep – ein neuer Web-Dienst; Monitoring landwirtschaftlicher Zuchtpopulationen. *ForschungsReport* 1/2010, S. 50-51.
- GROSCHUP, M.H., C. HOFFMANN, M. EIDEN, AND A. BALKEMABUSCHMANN. 2010. TSE – Ein Update. *In*: I. Verwuert, J.R. Aschenbach, G. Gäbel, A. Dausgshies (Hrsg.), Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress Band 2, Leipziger Universitätsverlag GmbH, ISBN: 978-3-86583-442-3, S. 311-314.
- HALLE, I., H. KLUTH, L. HÜTHER, AND S. DÄNICKE. 2010. Einfluss einer Staffelfung der Protein-Energie-Konzentration im Futter auf das Wachstum von Stubenkühen. *In*: Gierus, M., H. Kluth, M. Bulang, and H. Kluge (Hrsg.): 11. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 23.-25. November 2010, Lutherstadt Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-250-3, S. 95-97.
- HALLE, I. AND H. SCHENKEL. 2010. Einfluss von zwei Selenquellen auf die Leistungsmerkmale von Hennen. *In*: Gierus, M., H. Kluth, M. Bulang, and H. Kluge (Hrsg.): 11. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 23.-25. November 2010, Lutherstadt Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-250-3, S. 143-144.

- HENNING, K., A. HILBERT, AND A. RUNGE. 2010. Current Q-Fever situation in Germany and in the Netherlands – epidemiological and zoonotic aspects. *In: Epidemiologiczne zagrozenia dla zdrowia człowieka*, 20.09.2010, ISBN 978-83-89946-41-6.
- HOCHBERGER, J., S. DAMMER, D. MENKE, E. KRUSE, P. KÖHLER, AND K.-F. BÜRRIG. 2010. Technische Aspekte bei der endoskopischen Submukosa-Dissektion (ESD). 2010. *Endo-Praxis* **26**:120-125.
- HOCHBERGER, J., S. DAMMER, D. MENKE, E. KRUSE, P. KÖHLER, AND K.-F. BÜRRIG. 2010. Technische Aspekte bei der endoskopischen Submukosa-Dissektion (ESD). *Endo heute* **23**:24-33.
- HÖRETH-BÖNTGEN, D. AND W. BÖHLE. 2010. „Exotische Tierseuchen“ – Risiken und Bedrohungslage. *In: Greve, J.P. (Hrsg.) Erster Tierärztetag der Tierärztekammer Schleswig-Holstein am 06. Februar 2010 in Schleswig. Deutsche Gesellschaft für Kleintiermedizin, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft.* S. 59-71.
- KASPER, M., H. LENTZ, B. PETERSEN, AND T. SELHORST. 2010. Bedeutung von vektorspezifischen Datenbeständen bei der Analyse von Handelsstrukturen in der Fleisch erzeugenden Kette. *In: Claupen, W., L. Theuvsen, A. Kämpf, and M. Morgenstern (Hrsg.) Precision Agriculture Reloaded – Informationsgestützte Landwirtschaft, Referate der 30. GIL-Jahrestagung, 24.-25. Februar 2010 in Stuttgart, Germany, in Zusammenarbeit mit der AG Precision Farming der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften, Gesellschaft für Informatik e.V., S. 93-100.*
- KIRCHNER, J., G. MANTEUFFEL, AND L. SCHRADER. 2010. Können mit einer Aufrufstation für Wartesauen agonistische Interaktionen gesenkt werden? *KTBL-Schrift* **482**:127-136.
- KJAER, J.B., H. GLAWATZ, B. SCHOLZ, S. RETTENBACHER, AND R. TAUSON. 2010. Reducing Stress Welfare inspection – Validation of a non-intrusive version of the LayWel plumage scoring system for laying hens. *In: Proceedings of the XIIIth European Poultry Conference, Tours, France, 23rd-27th August 2010, S4-Welfare and Behaviour, CD Rom EISSN no. 1743-4777.*
- KLEIN, S., S. PETERSEN, U. TAYLOR, D. RATH, AND S. BARCIKOWSKI. 2010. Quantification of colloidal and intracellular gold nanomarkers down to the single particle level using confocal microscopy. *Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE* **7573**:75730L.
- KÖHLER, H. 2010. Epidemiologie und Bekämpfung der Tuberkulose beim Rind. *In: I. Verwuert, J.R. Aschenbach, G. Gäbel, A. Dauschies (Hrsg.), Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress, Leipziger Universitätsverlag GmbH, ISBN: 978-3-86583-442-3, S. 188-189.*
- KRAMER, M. 2010. Epidemiologische Aspekte in der Tierseuchenbekämpfung. *In: I. Verwuert, J.R. Aschenbach, G. Gäbel, A. Dauschies (Hrsg.), Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress, Leipziger Universitätsverlag GmbH, ISBN: 978-3-86583-442-3, S. 104-107.*
- KRAMER, M. AND P. WAGNER. 2010. Epidemiologische Aspekte und praktische Probleme bei der Einrichtung von Sperrgebieten im Seuchenfall. *In: 10. Fortbildungstagung des ÖVA – 2010 vom 14.-15. Oktober 2010 in Admont/Steiermark, S. 63-65.*
- KRAMER, M., P. WAGNER, AND J. TEUFFERT. 2010. Methodische Ansätze epidemiologischer Ausbruchsuntersuchungen im Tierseuchenfall. *Amtstierärztl Dienst Lebensmittelkontr* **17**:254-263.
- KRÜGER, D.H., J. HOFMANN, R.G. ULRICH, AND K. STARK. 2010. Handtavirusinfektionen – Massiver Anstieg an Erkrankungen in Deutschland. *Dtsch Ärztebl* **107**:A1517-A1518.
- KUETEMEYER, K., A. LUCAS-HAHN, B. PETERSEN, P. HASSEL, E. LEMME, H. NIEMANN, AND A. HEISTERKAMP. 2010. Functional enucleation of porcine oocytes for somatic cell nuclear transfer using femtosecond laser pulses. *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering* **7589**:75890A.
- KUTZER, T. UND B. BÜNGER. 2010. Spielgruppen für Saugferkel. *dlz primus schwein 02/2010, S. 22-25.*
- LIPPERT, J.P., P. REINHOLD, H.J. SMITH, P. FRANCO, S.Y. NATHER, C. SCHLÜTER, AND G.U. OECHTERING. 2010. Geometrie und Funktion der Hundense: Wie ändert sich die Funktion, wenn die Form verändert wird? *Pneumologie* **65**:452-453.
- LODE, E.J. AND H. NIEMANN. 2010. Statement of the German Society for Animal Production on the future of animal breeding and animal breeding research in Germany. *Züchtungskunde* **82**:99-101.
- MAKOSCHEY, B., P. FRANKEN, J.M.H. MARS, E. DUBOIS, C. SCHROEDER, J. THIRY, M. ÁLVAREZ, K. RYPULA, S. CAVIRANI, I. ARNAIZ, J.-Y. HOUTAIN, P. BARTAK, J. BROWNLIE, G. WOLF, G. MEYER, W. KLEE, M. BEER, V. MOENNIG, AND E. THIRY. 2010. IBR und BVD-Bekämpfung: der Schlüssel für erfolgreiches Herden-Management. *Berl Münch Tierärztl Wschr* **123**:516-518.
- MANTEUFFEL, G., L. SCHRADER, B. MANNEBECK, C. MANNEUFEL, MANNEWITZ, A., AND J. DANNENBRINK. 2010. Aufruf-Fütterung für tier- und produktionsgerechte Gruppenhaltung von Sauen. *In: ART-Tagungsband, 24. IGN-Tagung „Nachhaltigkeit in der Wiederkäuer- und Schweinehaltung, Tänikon, 3.-5. Juni 2010, S. 39-41.*
- METTENLEITER, T.C. 2010. Editorial. *Vet Microbiol* **143**:1.
- METTENLEITER, T.C. 2010. Aviäre Influenza: Problem erkannt – Problem gebannt? *In: I. Verwuert, J.R. Aschenbach, G. Gäbel, A. Dauschies (Hrsg.), Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress Band 2, Leipziger Universitätsverlag GmbH, ISBN: 978-3-86583-442-3, S. 206-209.*
- METTENLEITER, T.C. AND F.J. CONRATHS. 2010. Erregerbedingte Erkrankungen unter veränderten Umweltbedingungen. *In: Verwuert, I., J.R. Aschenbach, G. Gäbel, A. Dauschies (Hrsg.), Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress, Leipziger Universitätsverlag GmbH, ISBN: 978-3-86583-442-3, S. 174-178.*

- NEUBAUER, H. 2010. Brucellosis: New demands in a changing world. *Contributions, Sec Biol Med Sci, MASA* **31**:209-217.
- NEUBAUER, H. 2010. Zoonosen bei Nutztieren: eine Übersicht. *In: Verwuert, I., J.R. Aschenbach, G. Gäbel, A. Dausgchies (Hrsg.), Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress, Leipziger Universitätsverlag GmbH, ISBN: 978-3-86583-442-3, S. 426-430.*
- PAPPRITZ, J., U. MEYER, G. JAHREIS, G. FLACHOWSKY, AND S. DÄNICKE. 2010. Einfluss einer langfristigen gestaffelten Supplementation von pansenstabilen konjugierten Linolsäuren (CLA) auf Leistungsparameter und Milchinhaltsstoffe bei der Milchkuh. *Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung* 24./25.03.2010, S. 100-103.
- PFEFFER, M., S. ESSBAUER, K. NÖCKLER, J. JACOB, AND R.G. ULRICH. 2010. Aktueller Kenntnisstand zu Nagetier-übertragenen Zoonosen in Deutschland: Herausforderungen für die zukünftige Forschung. *Rdsch Fleischhyg Lebensmittelüberw* **62**:45-51.
- PROBST, C., B. HOFFMANN, AND F.J. CONRATHS. 2010. Datenübermittlung an das OIE – Handel ohne Grenzen? *Amtstierärztl Dienst Lebensmittelkontr* **17**:123-126.
- PROBST, C., D. KLÖSS, R. SCHRÖDER, A. MICKLICH, AND F.J. CONRATHS. 2010. TSN 3.0 – das neue Melde- und Krisenmanagementsystem für Tierseuchen. *Tierärztl Umschau* **65**:311-319.
- PROBST, C., P. KÖNIG, J. GETHMANN, D. HÖRETH-BÖNTGEN, C. STAU-BACH, F.J. CONRATHS, AND M. KRAMER. 2010. Ansteckende Blutarmut der Einhufer – der Status quo. *Dt Tierärztebl* **58**:1598-1605.
- RATH, D. AND U. TAYLOR. 2010. New technical and biological approaches to increase the fertilizing capacity of sex sorted bovine sperm. *Proc. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig* 01.-06.08.2010, Nr. 968:1-6.
- REINHOLD, P., S. GRÜTZENMACHER, R. PABST, R. KOCH, R. SCHULZ, N. KIRSCHVINK, G.U. OECHTERING, J.P. LIPPERT, K. FEY, AND M. ROSENBRUCH. 2010. Die oberen Atemwege im Speziesvergleich. 13. Workshop des Arbeitskreises „Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des Respiratorischen Systems“ (VPPRS) der Deutschen Gesellschaft für Veterinärmedizin (DVG) – in Kooperation mit der Sektion 10 der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP) (im Rahmen des 51. Kongresses der DGP). *Pneumologie* **64**:442-455.
- REINKING, E. 2010. Vektorübertragene Krankheiten – ein zunehmendes Problem? Fortbildungsveranstaltung des FLI-Fördervereins zu BTV, Zecken übertragenen Krankheiten und West-Nil-Fieber. *Tierärztl Umschau* **65**:347-349.
- REINKING, E. AND T.C. METTENLEITER. 2010. 100 Jahre Friedrich-Loeffler-Institut – 100 Jahre Forschung für die Tiergesundheit. *Tierärztl Umschau* **65**:361-369.
- ROHDE, G., E. STRAUBE, A. ESSIG, P. REINHOLD, AND K. SACHSE. 2010. Chlamydiale Zoonosen. *Dt Ärztebl* **107**:174-180.
- SACHSE, K. AND H. NEUBAUER. 2010. Chlamydiosen und Q-Fieber – durch intrazelluläre Bakterien verursachte Zoonosen. *In: Verwuert, I., J.R. Aschenbach, G. Gäbel, A. Dausgchies (Hrsg.), Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress Band 2, Leipziger Universitätsverlag GmbH, ISBN: 978-3-86583-442-3, S. 431-435.*
- SCHARES, G. UND F.J. CONRATHS. 2010. Parasitärer Einzeller verursacht Kälberverluste. *ForschungsReport* 2/2010, S. 38-41.
- SCHOLZ, B., J. KJAER, AND L. SCHRADER. 2010. Fettfreie Substrate bevorzugt. *DGS Magazin* 1/2010, S. 22-27.
- SCHOLZ, B., T. PICKEL, AND L. SCHRADER. 2010. Pressure load on Keel Bone and foot pads in perching Laying hens. *In: Proceedings of the XIIIth European Poultry Conference, Tours, France, 23rd-27th August 2010, S26-Poultry Welfare, CD Rom EISSN no. 1743-4777.*
- SCHRADER, L. 2010. Entwicklung der "Celler Kleinvoliere" für Legehennen. *KTBL-Schrift* **482**:196-206.
- SCHWARZ, S. 2010. Molecular basis and dissemination of antimicrobial resistance among bacteria. *Proceedings of the 8th International Symposium on Turkey Diseases, 27.-29.05.2010 in Berlin/Germany, S. 1-12.*
- SELIG, M., M. PFEFFER, AND T. SELHORST. 2010. Globalisierung und Epidemiologie – Neue Herausforderungen und neue Lösungen?! *Tierärztl Prax* **38(G)**:326-328.
- SIDI-BOUMEDINE, K., E. ROUSSET, K. HENNING, M. ZILLER, K. NIEMCZUCK, H.I.J. ROEST, AND R. THIÉRY. 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. *EFSA-Q-2009-00511*, <http://www.efsa.europa.eu/scdocs/scdoc/48e.htm>
- SPOLDERS, M. 2010. Macro and trace elements in blood of dairy cows after different supply. *Proc Soc Nutr Physiol* **19**:174-177.
- STEINBACH, F., K.E. MÜLLER, B. AASTED, M. AMADORI, M. BÜTTNER, S. CARTER, B. CHARLEY, J. DOMINGUEZ, C. FOSSUM, U. FISCHER, B. GODDEERIS, J. HOPKINS, B. KASPERS, E. MARTI, W. OLLIER, V.P. RUTTEN, A. SAALMÜLLER, A.K. STORSET, M. TOMAN, D. WERLING, C.N. WEBER, AND S. MAUEL. 2010. Summary of the third European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), September 2009, Berlin, Germany. *Vet Immunol Immunopathol* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.vetimm.2010.06.008]
- SÜDEKUM, K.-H. AND G. FLACHOWSKY. 2010. Energy and Nutrient Supply to Dairy Cows in Germany. *Cattle Res Special Issue* 46-52.
- SÜSS, J. 2010. FSME – Kein Anlass zur Entwarnung. *JATROS Infektiologie* **1/2010**:28-30.
- SÜSS, J., AND O. KAHL. 2010. Editorial. *Ticks Tick-borne Dis* **1**:1-2.
- SÜSS, J., O. KAHL, H. ASPÖCK, K. HARTELT, A. VAHERI, R. OEHME, G. HASLE, H. DAUTEL, C. KUNZ, N. KUPREVICIENE, S. RANDOLPH, H.-P. ZIMMERMANN, B. ATKINSON, G. DOBLER, K. KUTSAR, F.X. HEINZ, AND R. STEFFEN. 2010. Tick-borne encephalitis in the age of general mobility. *Wien Med Wochenschr* **160**:94-100.

- TAYLOR, U. AND D. RATH. 2010. Flow cytometrial sex sorting of buffalo sperm: status and opportunities. Proceedings of the International Buffalo Conference, Delhi, India, 01.-04.02.2010, S. 190-195.
- TEUFFERT, J., C. STAUBACH, AND M. KRAMER. 2010. In: Pfannenstiel, H.D. (Hrsg.), Schwarzwild in Brandenburg – Analysen, Perspektiven, Lösungen. Landesjagdverband Brandenburg e.V. (2010), S. 32-43
- TRIEBENBACHER, C., C. KLINC, B. VON WISSMANN, W. HAUTMANN, J. JACOB, M. FABER, K. STARK, J. SCHMIDT-CHANASIT, D.H. KRÜGER, R.G. ULRICH, AND S. ESSBAUER. 2010. Erhöhte Zahl von Hantavirusinfektionen zu einer ungewohnten Zeit in Bayern. *Blickpunkt Waldschutz* 6/2010, S. 1-4.
- TZSCHENTKE, B., AND I. HALLE. 2010. „Temperature training“ during the last days of incubation: a new method to improve poultry performance. *Lohmann Information* 45:27-33.
- ULRICH, R.G. 2010. 2010 – wieder ein Hantavirusjahr? *AFZ-Der Wald* 8/2010, S. 44.
- WEIGEND, S. 2010. Woher kommen unsere Hühner? Molekulare Marker helfen bei der Abgrenzung genetischer Gruppen der Haushühner. *ForschungsReport* 1/2010, S. 16-19.
- WEIGOLDT, M., J. MEENS, K. DOLL, I. FRITSCH, P. MÖBIUS, R. GOETHE, AND G.F. GERLACH. 2010. Differential proteome analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* grown *in vitro* and isolated from cases of clinical Johne's disease. *Microbiology* [Epub ahead of print; doi: 10.1099/mic.0.044859-0].
- WEISSMANN, F., U. BAULAIN, W. BRADE, D. WERNER, AND H.R. BRANDT. 2010. Alt oder Neu – Welche Rassen passen für die ökologische Schweinefleischherzeugung? In: Rahmann, G. (Hrsg.) Ressortforschung für den Ökologischen Landbau 2009. *Landbauforschung – vTI agriculture and forestry research, Sonderheft* 335:13-20.
- WEISSMANN, F., J. LAPP, U. BAULAIN, W. BRADE, K. FISCHER, AND H. BRANDT. 2010. Zum Einfluss unterschiedlich hoher Duroc-Genanteile auf Mastleistung sowie Schlachtkörper- und Fleischqualität unter ökologischen Produktionsbedingungen. In: Rahmann, G. (Hrsg.) Neues aus der ökologischen Tierhaltung 2010. *Landbauforschung – vTI agriculture and forestry research, Sonderheft* 341:27-32.
- WITTMANN, W., V. KADEN, H. KÜSTER, S. TESMER, E. LANGE, N. PIONTKOWSKI, AND B. LANGE. 2010. Bekämpfung der Klassischen Schweinepest (KSP) – ein Update. *Prakt Tierarzt* 91:1008-1010.
- ZERBE, F. 2010. Tier- und Klauengesundheit von Mastbullen auf Spaltenböden. In: 8. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, Berlin, 7.-9. Oktober 2010, ISBN: 978-3-86955-489-1, S. 211-214.
- ZERBE, F. 2010. Tiergesundheit und Tierschutz in der Bullenmast. In: DVG, Tagung der Fachgruppen „Tierschutz“ und „Versuchstierkunde“ in Verbindung mit der Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen, GV-Solas und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz, Verlag der DVG Service GmbH, ISBN: 978-3-941703-59-9, S. 213-219.

2.3 BÜCHER UND BUCHBEITRÄGE

- ACHILLES, W., I. BENDA, E. VON BORELL, W. PFLANZ, M. SCHICK, L. SCHRAEDER, AND R. WEBER. 2010. Beschäftigungsmöglichkeiten für Schweine. *KTBL-Heft 87*, Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V., Darmstadt. 48 S. ISBN 978-3-941583-43-6.
- BERGMANN, S.M., D. FICHTNER AND H.-J. SCHLOTTFELDT. 2010. Koi-Herpesvirus (KHV)-Infektion der Karpfen. In: Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel*. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 148-151.
- BERK, J. 2010. Technik in der Geflügelhaltung – Machinery and Techniques for Poultry Husbandry. In: Harms, H.H., F. Meier, and R. Metzner (eds.), *Jahrbuch Agrartechnik 2010 – Yearbook Agricultural Engineering 2010*, DLG Verlag, ISBN: 978-3-7690-0761-9, S. 192-196.
- BERK, J. 2010. Faustzahlen zur Haltung von Mastgeflügel. *Geflügeljahrbuch 2011*, Ulmer Verlag, ISBN: 978-3-8001-6988-7, S. 144-165.
- DUCHEV, Z., E. GROENEVELD, M. HENNING, AND H. LICHTENBERG. 2010. *CryoWEB – User's Guide and Reference Manual*. Applications in Biodiversity Informatics. Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institute of Farm Animal Genetics. 172 S. ISBN 978-3-9813280-0-4.
- GROSCHUP, M.H. UND O.-R. KAADEN. 2010. Transmissible Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE). In: Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel*. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 31-34.
- GROSCHUP, M.H. UND O.-R. KAADEN. 2010. Scrapie. In: Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel*. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 59-62.
- HAAS, B. 2010. Maul- und Klauenseuche (MKS). In: Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel*. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 20-22.
- HARDER, T. UND C. GRUND. 2010. Aviäre Influenza. In: Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel*. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 152-155.

- HARDER, T. UND C. GRUND.** 2010. Newcastle Erkrankung. *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 155-159.
- HARDER, T. UND L. HAAS.** 2010. Rinderpest (RP). *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 23-24.
- HARDER, T. UND L. HAAS.** 2010. Pest der kleinen Wiederkäuer. *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 52-54.
- HARDER, T. UND L. HAAS.** 2010. Hundestaupe. *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 108-110.
- KAMPEN, H.** Laufmilben (Acari, Trombiculidae) als Krankheitserreger und -überträger. 2010. *In:* Aspöck, H. (Hrsg.), Krank durch Arthropoden, Denisia 30, S. 137-148.
- METTENLEITER, T. UND T. MÜLLER.** 2010. Aujeszkysche Krankheit. *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover, 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 82-85.
- NIEMANN, H.** 2010. Gene und Klone: Stand und Perspektiven der Biotechnologie für eine zielgenaue Tierproduktion. *In:* Mietzsch, A. (Hrsg.), Kursbuch Biopolitik, Vol. 4. Biocom Media GmbH, Berlin. 222 S. ISBN-13: 978-3928383347, S. 172-187.
- SCHLOTFELDT, H.-J., D. FICHTNER UND S.M. BERGMANN.** 2010. Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS). *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 137-140.
- SCHLOTFELDT, H.-J., D. FICHTNER UND S.M. BERGMANN.** 2010. Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN). *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 140-143.
- SCHLOTFELDT, H.-J., D. FICHTNER UND S.M. BERGMANN.** 2010. Frühlingsvirämie der Karpfen (SVC). *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 143-145.
- SCHLOTFELDT, H.-J., D. FICHTNER UND S.M. BERGMANN.** 2010. Infektiöse Pankreasnekrose der Forellen und forellenartigen Fische (IPN). *In:* Liess, B., V. Moennig und L. Haas (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere – Fische – Geflügel. 3., erweiterte und aktualisierte Ausgabe. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. 234 S. ISBN: 978-3-89993-064-1, S. 145-148.
- SÜSS, J.** 2010. VIII – 1.44 Rückfallfieber. *In:* Hofmann, F. (Hrsg.), Handbuch der Infektionskrankheiten, 35. Erg.Lfg. 4/10, ecomed. ISBN: 978-3-609-10460-7.
- WERNER, D. UND H. KAMPEN.** 2010. Gnitzen (Diptera, Ceratopogonidae) und ihre medizinische Bedeutung. *In:* Aspöck, H. (Hrsg.), Krank durch Arthropoden, Denisia 30, S. 245-260.

3 ARBEITEN ZUR ERLANGUNG EINES AKADEMISCHEN GRADES, AUSZEICHNUNGEN UND PREISE

3.1 DISSERTATIONEN

- BINTINTAN, DANIELA IOANA** (Tübingen, IFI): Virus der klassischen Schweinepest: Prozessierung des E^{ms}-Glykoproteins (Eberhard-Karls-Universität, Tübingen)
- BOONPRONG, SUVIT** (ING): Heat tolerance indicators for beef cattle in the tropics with special reference to blood biochemical properties (Kasetsart University, Thailand, Kasetsart)
- BREHM, KATHARINA** (IVD): Homologe und heterologe Schutzwirkung von MKS-Serotyp-A-Vakzinen und Etablierung der fetalen Ziegenzungenzelllinie (ZZ-R 127) zur Isolation von MKSV (Freie Universität Berlin)
- CUC, NGO THI KIM** (ING): Vietnamese local chicken breeds: Genetic diversity and prioritising breeds for conservation. (Georg-August-Universität, Göttingen)

- DÄNICKE, SVEN** (ITE): Experiments on the formation of deoxy-nivalenol (DON) sulfonate (DONS) through wet treatment of DON contaminated cereal grains with sodium metabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, SBS) and investigations of the effects of DON, DONS and SBS on rearing piglets and on various porcine cell types *in vitro* (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)
- DECKERS, DANIELA** (IMB): Aviäre Influenza Virus (AIV) Marker-vakzinen auf Basis des Newcastle Disease Virus (NDV) als Vektor: Herstellung, Charakterisierung und Prüfung einer AIV H9 Hämagglutinin-exprimierenden NDV-Rekombinante gegen niedrigpathogenes AIV, sowie Prüfung H5 bzw. N1 Neuraminidase-exprimierender NDV-Rekombinanten gegen hochpathogenes AIV (Freie Universität Berlin)
- ESCHBAUMER, MICHAEL** (IVD): Recent Developments in Immunoprophylaxis, Diagnosis and Epizootiology of Bluetongue Virus in Germany (Ludwig-Maximilians-Universität, München)
- GARRELS, WIEBKE** (ING): Transgene Expression durch zytoplasmatische Injektion von Plasmiden und Transposon basierten Konstrukten in Säugerembryonen (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)
- GIERKE, FRANZISKA** (IMP): Ermittlung von Einflussfaktoren auf die intra vitam Diagnostik der Paratuberkulose (Freie Universität Berlin)
- GOHRBANDT, SANDRA** (IMB): Virulenzpotential des Hämagglutinins verschiedener Serotypen aviärer Influenza-Viren (Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald)
- GRABHERR, HILDE** (ITE): Einfluss von Zeolith A auf die Futteraufnahme, den Mineralstoff- und Energiestoffwechsel im peripartalen Zeitraum sowie auf verdauungsphysiologische Parameter und Abbauverhalten im Gastrointestinaltrakt von Milchkühen (Universität Leipzig)
- GWIDA, MAYADA** (IBIZ): Isolation, Identification and Typing of *Brucella* Species as Zoonotic Pathogens by Using Conventional and Molecular Biological Methods (Freie Universität Berlin)
- HILDENBRAND, ANJA** (IMP): Variabilität und Reproduzierbarkeit lungenfunktionsdiagnostischer Kenngrößen klinisch gesunder Schafe (Freie Universität Berlin)
- HÖNSCHEID, ANDREA** (ITE): Die Rolle von Zink in der Signaltransduktion von T-Zellen (Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen)
- KUHN, JANA** (IMB): Vergleichende Analyse der essentiellen Proteine pUL25 und pUL17 des Pseudorabies Virus und Herpes Simplex Virus 1 (Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald)
- LEIFER, IMMANUEL** (IVD): Differenzierung von infizierten und geimpften Tieren bei der Klassischen Schweinepest: Entwicklung und Optimierung von Vakzinen und begleitenden diagnostischen Tests (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald)
- MARESCH, CHRISTINA** (IMB/IMED/ATB): Studien zur Neuroinvasion und zum axonalen Transport von Mutanten des Pseudorabiesvirus im Tiermodell und an Neuronenkulturen (Justus-Liebig-Universität, Gießen)
- MERTENS, MARC** (INNT): Entwicklung serologischer Testverfahren zum Nachweis Hantavirus-spezifischer Antikörper und deren Anwendung bei epidemiologischen Untersuchungen (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald)
- OHLEMEYER, STEFANIE** (IMED): Identifizierung und Differenzierung ausgewählter Iridoviren (Ludwig-Maximilians-Universität, München)
- ORTEGA SOTO, ELIZABETH** (INNT): Influence of single amino acid polymorphisms on the *in vitro* convertibility of goat prion protein (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald)
- PAVLOVA, SOPHIA** (IMB): Generation and evaluation of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) recombinants as live and vectored vaccines against ILTV and avian influenza virus infections of chickens (Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald)
- RAGALLER, VERONIKA** (ITE): Effect of folic acid and panthothenic acid supplementation to two rations on rumen fermentation, duodenal nutrient flow and serum and milk variables in dairy cows (Universität Bonn)
- REICHEL, THOMAS** (IMP): Experimentelle Infektion mit *Mycoplasma bovis* und Auswirkungen auf die äußere Atmung beim Kalb (Freie Universität Berlin)
- SALAM, HALA** (IBIZ): Studies on the bacterial causes of bovine mastitis with special references to *Mycoplasma* spp. (Beni Suef University, Ägypten)
- SATTLER, STEPHANIE** (IMP): Untersuchungen zur Klinik, Pathologie und Pathogenese der experimentellen *Brachyspira*-hyodysenteriae-Infektion beim Schwein (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)
- SCHÜRMANN, EVA-MARIA** (IfI): Viren der Bovinen Virusdiarrhoe und der Klassischen Schweinepest - Einfluss von Mutationen auf Persistenzentwicklung, Virulenz und Induktion einer Interferonantwort (Justus-Liebig-Universität, Gießen)
- VELAZQUEZ, MIGUEL** (ING): The influence of insulin-like growth factor 1 on *in vivo* oocyte developmental competence and *in vitro* preimplantation embryo development in cattle (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)
- VON CZAPIEWSKI, ELLEN** (ING): Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen mit dem Verfahren der Bouillon-Mikrodilution bei pathogenen Bakterien von Fischen und molekulare Charakterisierung von Resistenzgenen (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

3.2 DIPLOMARBEITEN

BREZINA, ULRIKE (ITE): Entwicklung einer Probenaufbereitungsmethode zur Bestimmung von T-2 Toxin und Metaboliten im Blutplasma mit LC-MS/MS (Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg)

GENZ, BERIT (IMB): Molekularbiologische Analyse genotypspezifischer Glykoprotein-Funktionen in der Lyssavirus Replikation und Pathogenese (Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald)

PROPP, TANJA (IMB): Live Imaging der Lyssavirus Replikation: Vergleich der intrazellulären Lokalisation von viralen Strukturen in verschiedenen Zellkultursystemen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Virusproteinen (Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald)

SCHÖRG, ALEXANDRA (Tübingen, IfI): Mechanismus der antiviralen Wirkung heterozyklischer Substanzen bei der Influenzavirus Replikation (Universität Hohenheim)

SIEG, MICHAEL (IBIZ): Identifizierung und Charakterisierung von Cholesterin-abhängigen Cytolysinen bei human- und tiermedizinisch relevanten Clostridien-Spezies (Friedrich Schiller Universität, Jena)

SUTOR, ASTRID (IfE): The ecology of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*, Gray 1834) – an invasive canid in Germany (Universität Freiburg)

TRUAR, ANNE HELENE (ITT): Mechanismus der antiviralen Wirkung heterozyklischer Substanzen bei der Influenzavirus Replikation (Universität Hohenheim)

WARLICH, SANDRA (IMB): Untersuchung des Einflusses der Oberflächenproteine des Paramyxovirus-1 der Taube auf die Pathogenität des Newcastle Disease Virus (Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald)

WIDERA, NADJA (IMP): Gewinnung, Charakterisierung und Nachweis der biologischen Wirksamkeit von Glykolipiden der Zellwand verschiedener Mykobakterien-Spezies (Hochschule Darmstadt)

YOO, YOUNG EUN (Tübingen, IfI): Immunmodulatorische Rolle des zellulären Prion-Proteins bei der antiviralen Immunantwort (Eberhard-Karls-Universität, Tübingen)

3.3 MASTERARBEITEN

BAUER, ANJA (IMB): Analyse früher Stadien während der Infektion von Zellkulturen mit dem Virus der afrikanischen Schweinepest. (Universität Rostock)

BERGMANN, ANNABEL (ING): Einfluss von verschiedenen Lagertemperaturen und Natirumfluorid auf die Lagerungsqualität von gesextem Bullensperma (Georg-August-Universität, Göttingen)

ESSER, ANNETTE (ITT): Prävalenz von Pododermatitis und Tierleistungen in Abhängigkeit von Besatzdichte und Nutzung eines Außenklimabereiches in der Mast von Puten (Georg-August-Universität, Göttingen)

3.4 BACHELORARBEITEN

ALEKSIC, DENIS (Tübingen, IfI): Die Immunrezeptoren der equinen Karzinoembryonalen Antigen-Familie (Hochschule Furtwangen)

BILLERBECK, CARMEN (ING): Vergleich verschiedener phäno- und genotypischer Methoden zur Bestimmung der Methicillinresistenz bei koagulasenegativen Staphylokokken aus Fällen boviner Mastitis (Hochschule Furtwangen)

DREIER, CAROLA CHRISTIANE CATHARINA (Tübingen, IfI): Untersuchungen zur Wirkungsweise von anti-Influenza wirksamen heterozyklischen Substanzen (Hochschule Furtwangen)

KLING, STEFANIE (Tübingen, IfI): Untersuchungen zur antiviralen Wirkung kleiner heterozyklischer Substanzen und zur Resistenzbildung des Influenzavirus gegen diese Substanzen (Hochschule Furtwangen)

LACROIX, PIA (Tübingen, IfI): Untersuchungen zur Herstellung von kreuzprotektiven Hämagglutinin-spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Influenza A Viren nach mRNA Vakzinierung (Fachhochschule Kaiserslautern)

MÜHLENKAMP, MELANIE (Tübingen, IfI): Fremdge Expression in neuen Orf-Virusrekombinanten (Hochschule Furtwangen)

REHAGE, REBECCA (ITE): Vergleich von pH-Wert und Temperaturen zwischen ventralem und dorsalem Pansensack von Milchkühen unter Verwendung moderner RFID-Technik bei variierenden Kraftfutteranteilen (Georg-August-Universität, Göttingen)

4. REDAKTIONELLE MITARBEIT IN WISSENSCHAFTLICHEN ZEITSCHRIFTEN

Die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des FLI arbeiten in der Redaktion bzw. im Editorial Board von Fachzeitschriften mit und tragen so zur Verbreitung wissenschaftlicher Ergebnisse bei. Neben dieser redaktionellen

Tätigkeit agieren sie auch regelmäßig als Gutachter für nationale und internationale Fachzeitschriften, die hier aber nicht im Einzelnen aufgelistet werden.

Name	Wissenschaftliche Zeitschrift
Dr. A. Balkema-Buschmann (INNT)	ISRN Veterinary Science
Dr. U. Baulain (ING)	POLJPRIVREDA (Agriculture)
PD Dr. M. Beer (IVD)	Veterinary Microbiology
Dr. S.M. Bergmann (IMED)	Journal of Elementology
Dr. J. Berk (ITT)	Landbauforschung Völkenrode
PD Dr. F. Conraths (IfE)	Zoonoses and Public Health
Prof. Dr. Dr. S. Dänicke (ITE)	Archiv für Geflügelkunde - European Poultry Science Archives of Animal Nutrition Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research Mycotoxin Research
Prof. Dr. G. Flachowsky (ITE)	Animal Feed Science and Technology Archives of Animal Nutrition Italian Journal of Animal Science Journal of Animal and Feed Science Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition Journal of Applied Animal Research Übersichten zur Tierernährung
Prof. Dr. Dr. h. c. mult. E. Groeneveld (ING)	Annals of Animal Science Archiv für Tierzucht Veterinärmedizin und Zootechnik; Litauische Veterinärakademie
Prof. Dr. M.H. Groschup (INNT)	Journal of General Virology Veterinary Research
Dr. R. Großmann (ING)	Slovak J. Animal Science
PD Dr. C. Grund (IVD)	Tierärztliche Praxis
PD Dr. I. Halle (ITE)	Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research
Prof. Dr. T. Harder (IVD)	Journal of General Virology Veterinary Medicine International
Dr. G. Keil (IMB)	Archives of Virology
Dr. J. Kjaer (ITT)	Applied Animal Behaviour Science British Poultry Science Ltd.
Dr. B.G. Klupp (IMB)	Archives of Virology
Dr. W.A. Kues (ING)	Open Journal of Zoology

Name	Wissenschaftliche Zeitschrift
Prof. Dr. Dr. h.c. T.C. Mettenleiter (IMB)	OIE Scientific and Technical Review Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Journal of Virology Transboundary and Emerging Diseases
Dr. T. Müller (IFE)	Veterinary Microbiology
Prof. Dr. H. Niemann (ING)	Cellular Reprogramming Molecular Reproduction and Development Reproduction Theriogenology
Prof. Dr. N. Parvizi (ING)	Animal Reproduction Science Domestic Animal Endocrinology Endocrine Reviews Journal of Steroids & Hormonal Science World Journal of Diabetes
Dr. A. Raßbach (IBIZ)	Reproduction in Domestic Animals Slovenian Veterinary Research Spanish Journal of Agricultural Research
PD Dr. Dr. P. Reinhold (IMP)	Journal of Breath Research
Dr. K. Sachse (IMP)	Molecular and Cellular Probes The Veterinary Journal Veterinary Microbiology Veterinary Research Communications
Dr. L. Schrader (ITT)	Landbauforschung Völkenrode
Prof. Dr. S. Schwarz (ING)	FEMS Microbiology Letters Frontiers in Microbiology Journal of Antimicrobial Chemotherapy Microbial Drug Resistance Veterinární medicína (Vet Med - Czech) Veterinary Microbiology
PD Dr. J. Süß (IBIZ)	Ticks and Tick-borne Diseases
Prof. Dr. J.P. Teifke (ATB)	Veterinary Pathology
PD Dr. Dr. T.W. Vahlenkamp (IMED)	Clinical and Vaccine Immunology Veterinary Immunology and Immunopathology Virus Genes