**Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz**

Friedrich-Loeffler-Institut

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Jahresbericht 2006

Impressum:

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für
Tiergesundheit
Boddenblick 5 a
17493 Greifswald - Insel Riems
Telefon: 03 83 51-70
Telefax: 03 83 51-72 26; 71 51
E-mail: poststelle@fli.bund.de
Internet: www.fli.bund.de

Präsident:
Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. T. C. Mettenleiter

Schriftleitung:
Prof. Dr. Th. C. Mettenleiter
E-mail: thomas.mettenleiter@fli.bund.de

Redaktion:
E. Reinking
E-mail: elke.reinking@fli.bund.de

Insel Riems, 2007

ISSN: 1861-0005

Insel Riems, den 15.03.07

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

das zurückliegende Jahr 2006 hielt für das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI), wiederum einige Herausforderungen bereit. Am Valentinstag 2006 trat 'Vogelgrippe', genauer gesagt hoch pathogenes aviäres Influenzavirus H5N1 Typ Asia, erstmals in Deutschland auf. Das nachfolgende Seuchengeschehen forderte den vollen Einsatz der beteiligten Kolleginnen und Kollegen und rückte das Institut noch stärker in das Interesse von Politik und Öffentlichkeit.

Damit nicht genug kamen im März wieder einmal Ausbrüche von Schweinepest in Nutztierbeständen dazu. Seit dem 21. August 2006 ist Deutschland auch nicht mehr frei von der Blauzungenkrankheit. Und zuletzt war Ende September noch ein Ausbruch der infektiösen Blutarmut der Einhufer zu verzeichnen. Auch der Nachweis von Rotz bei einem aus Brasilien importierten Pferd war ein nicht alltägliches Ereignis. Ein ereignisreiches Jahr also, das neben den ohnehin ständig zu bewältigenden Aufgaben die Leistungsfähigkeit des FLI auf die Probe stellte. Diese bestand das Institut mit Erfolg. Es entwickelte damit nicht nur in Fachkreisen seinen guten Ruf weiter, sondern gewann auch in der Öffentlichkeit an Profil. Dies wurde auch durch eine Vielzahl von Berichten in Zeitungen, Journalen, Radiosendungen und Fernsehbeiträgen deutlich. Das „FLI“ ist über regionale Grenzen hinaus bekannt und als kompetenter Ansprechpartner geschätzt.

Dabei hat sich gezeigt, dass die grundsätzliche Ausrichtung des FLI von der Grundlagenforschung bis zur angewandten Arbeit richtig war und ist. Es ist zwar kein „Bundesveterinäruntersuchungsamt“ und auch keine zentrale deutsche Tierseuchenbekämpfungsbehörde, aber im Ernstfall ist das FLI in der Lage, aus dem Stand heraus in erheblichem Umfang nicht nur Hilfestellung bei der Diagnostik zu leisten, sondern auch mit epidemiologischen Sachverstand vor Ort unterstützend tätig zu sein. Und das alles, ohne die Forschung zu vernachlässigen, was durch eine Vielzahl von Veröffentlichungen in internationalen Journalen mit zum Großteil recht beachtlichen Impact-Faktoren belegt wird.

Wie oft in solchen Fällen wird der Öffentlichkeit erst in problematischen Zeiten klar, wie wichtig die Arbeit des FLI ist. Dass dies dann auch zur Erweiterung von Forschungskapazitäten führt, ist notwendig, um die gestellten Fragen auch weiterhin kompetent beantworten zu können. Es ist also durchaus auch ein Zeichen der Wertschätzung dieser Arbeit, dass in erheblichem Umfang zusätzliche Fördergelder für die wissenschaftliche Arbeit des FLI zur Verfügung gestellt wurden. So war es bei BSE und so trifft es auch auf das Forschungs-Sofortprogramm-Influenza der Bundesregierung zu. Unsere Aufgabe ist es, dies in entsprechende erstklassige Ergebnisse und hochkarätige Veröffentlichungen umzusetzen.

Neben der Inanspruchnahme im nationalen Bereich arbeitet das FLI auch zunehmend auf internationaler Ebene. Die Ernennung zum „Collaborating Centre for Zoonoses in Europe“ durch die Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) im Mai dokumentiert die internationale Anerkennung der fachlichen Kompetenz des FLI. Mehr und mehr wird von internationalen Organisationen wie der FAO, der OIE oder der EU die Expertise des FLI angefragt. Ein sichtbares Zeichen dafür ist auch die führende Rolle des FLI im Exzellenznetzwerk „Epizone“ der EU.

Das umfassendste Investitionsvorhaben des FLI ist der Neubau von Labor- und Stallgebäuden auf der Insel Riems. Hier laufen die vorbereitenden Maßnahmen planmäßig, so dass der 10. Oktober 2010 weiterhin als unser Ziel für die Inbetriebnahme bestehen bleibt. Die Planungsunterlagen wurden in den letzten Tagen fristgerecht an die Baubehörde übergeben, so dass jetzt die Suche nach einem Generalunternehmer weitergehen kann, der dann die Vorlagen umsetzt. Auch am Standort Jena sind Neubau- und Rekonstruktionsmaßnahmen angelaufen, die eine langfristige Nutzung des Standorts sicherstellen sollen. Aber auch hier ist noch viel zu tun.

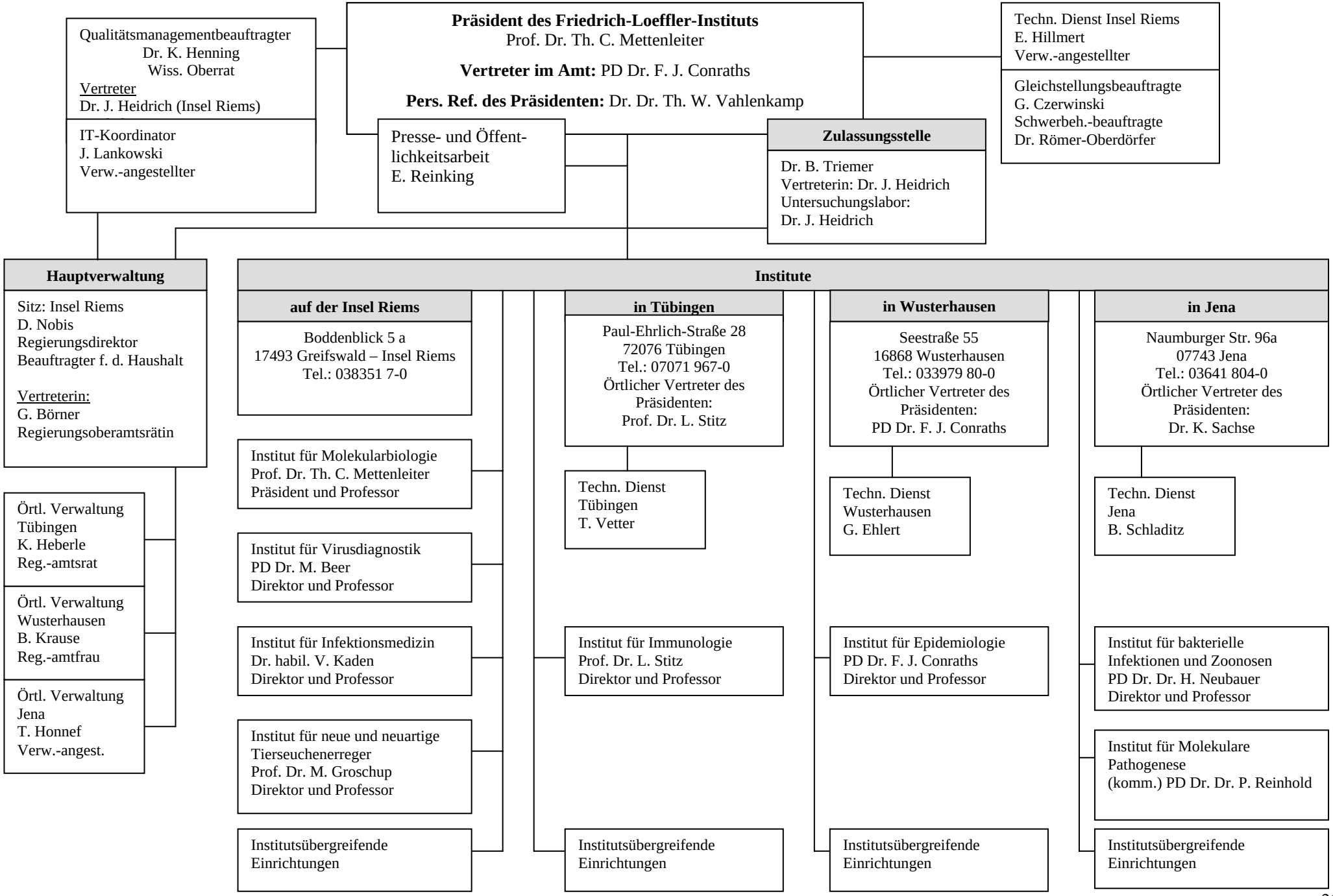
Alle diese Aufgaben sind nur durch die engagierte Mitarbeit aller Beschäftigten des FLI zu schaffen. Dies betrifft alle Standorte und alle Bereiche. Für dieses Engagement und die konstruktive Kooperation zum

Wohle aller Beschäftigten möchte ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des FLI ganz besonders danken.

Der vorliegende Jahresbericht 2006 gibt Ihnen, liebe Leserinnen und Leser, einen Überblick über die vielfältigen Arbeiten des FLI im vergangenen Jahr. Ich wünsche Ihnen bei der Lektüre viel Spaß und würde mich über eine positive Resonanz freuen.

Mit den besten Wünschen
Ihr

Prof. Dr. Thomas C. Mettenleiter


Präsident des Friedrich-Loeffler-Instituts
Prof. Dr. Th. C. Mettenleiter
Vertreter im Amt: PD Dr. F. J. Conraths
Pers. Ref. des Präsidenten: Dr. Dr. Th. W. Vahlenkamp
Qualitätsmanagementbeauftragter
Dr. K. Henning
Wiss. Oberrat
Vertreter
Dr. J. Heidrich (Insel Riems)
IT-Koordinator
J. Lankowski
Verw.-angestellter
Presse- und Öffentlichkeitsarbeit
E. Reinking
Zulassungsstelle
Dr. B. Triemer
Vertreterin: Dr. J. Heidrich
Untersuchungslabor:
Dr. J. Heidrich
Techn. Dienst Insel Riems
E. Hillmert
Verw.-angestellter
Gleichstellungsbeauftragte
G. Czerwinski
Schwerbeh.-beauftragte
Dr. Römer-Oberdörfer
Hauptverwaltung
Sitz: Insel Riems
D. Nobis
Regierungsdirektor
Beauftragter f. d. Haushalt
Vertreterin:
G. Börner
Regierungsoberamtsrätin
Örtl. Verwaltung
Tübingen
K. Heberle
Reg.-amtsrat
Örtl. Verwaltung
Wusterhausen
B. Krause
Reg.-amtfrau
Örtl. Verwaltung
Jena
T. Honnef
Verw.-angest.
Institute
auf der Insel Riems
Boddenblick 5 a
17493 Greifswald – Insel Riems
Tel.: 038351 7-0
Institut für Molekularbiologie
Prof. Dr. Th. C. Mettenleiter
Präsident und Professor
Institut für Virusdiagnostik
PD Dr. M. Beer
Direktor und Professor
Institut für Infektionsmedizin
Dr. habil. V. Kaden
Direktor und Professor
Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger
Prof. Dr. M. Groschup
Direktor und Professor
Institutsübergreifende Einrichtungen
in Tübingen
Paul-Ehrlich-Straße 28
72076 Tübingen
Tel.: 07071 967-0
Örtlicher Vertreter des Präsidenten:
Prof. Dr. L. Stitz
Techn. Dienst
Tübingen
T. Vetter
Institut für Immunologie
Prof. Dr. L. Stitz
Direktor und Professor
Institutsübergreifende Einrichtungen
in Wusterhausen
Seestraße 55
16868 Wusterhausen
Tel.: 033979 80-0
Örtlicher Vertreter des Präsidenten:
PD Dr. F. J. Conraths
Techn. Dienst
Wusterhausen
G. Ehlert
Institut für Epidemiologie
PD Dr. F. J. Conraths
Direktor und Professor
Institutsübergreifende Einrichtungen
in Jena
Naumburger Str. 96a
07743 Jena
Tel.: 03641 804-0
Örtlicher Vertreter des Präsidenten:
Dr. K. Sachse
Techn. Dienst
Jena
B. Schladitz
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
PD Dr. Dr. H. Neubauer
Direktor und Professor
Institut für Molekulare Pathogenese
(komm.) PD Dr. Dr. P. Reinhold
Institutsübergreifende Einrichtungen

Inhaltsverzeichnis

I. Aufgaben 7

II. Überblick

Organisation 9

Die Institute 11

Beschäftigte und Organigramm 19

III. Ausgewählte Schwerpunktthemen 23

Institut für Molekularbiologie: 25
Markervakzinen gegen aviäre Influenza

Institut für Virusdiagnostik / Institut für Epidemiologie: 33
Untersuchungen des Friedrich-Loeffler-Instituts zu Ausbrüchen hochpathogener aviärer Influenza bei Wildvögeln, Säugetieren und einem Hausgeflügelbestand in Deutschland 2006

Institut für Infektionsmedizin: 41
Bachforellensterben in voralpinen Flüssen Bayerns – infektions- und immunbiologische Untersuchungen zur Ursache der Krankheit

Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger: 55
Hantaviren: Entwicklung von serologischen Nachweisverfahren und Untersuchungen zur Verbreitung in Deutschland

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen: 67
Rotz – Ein im Jahr 2006 nach Deutschland importierter Rotz-Fall zeigt, dass diese Erkrankung eine allgegenwärtige Gefahr ist

Institut für molekulare Pathogenese: 73
Organisiertes Schleimhaut-assoziiertes Lymphgewebe: Struktur und Funktion bei Rind, Schaf, Schwein und Pferd

Institut für Immunologie: 81
CYSTUS052, ein Polyphenol-reiches Pflanzenextrakt, zeigt antivirale Aktivität gegen hochpathogene Influenzaviren

IV. Laufende Forschungsprojekte

1 **Viren**

RNA-Viren

1.1 Bornaviren 91

1.2 Bunyaviren 91

1.3 Caliciviren 92

1.4 Flaviviren 93

1.5 Orthomyxoviren 101

1.6 Paramyxoviren 111

1.7 Picornaviren 113
1.8 Reoviren 115
1.9 Retroviren 117
1.10 Rhabdoviren 119
1.11 Togaviren 123

DNA-Viren

1.12 Herpesviren 123
1.13 Iridoviren 135
1.14 Papillomviren 135
1.15 Pockenviren 136

1.16 Nicht klassifizierte Viren 137

2 **Immunologie**

2.1 Immunsystem des Schweines 137
2.2 Immunsystem der Wiederkäuer 138
2.3 Immunsystem des Geflügels 140
2.4 Immunsystem der Fische – Grundlagenuntersuchungen 141

3 **Bakterien**

3.1 Campylobacter 143
3.2 Chlamydien und Coxiellen 144
3.3 Escherichia coli 147
3.4 Francisellen 148
3.5 Mykobakterien 149
3.6 Salmonellen 154
3.7 S3-Erreger (Bacillus anthracis, Brucellen, Burkholderia mallei) 156
3.8 Durch Zecken übertragene Krankheiten 158
3.9 Bakterielle und virale Mischinfektionen 159

4 **Neue und neuartige Zoonose-Erreger**

4.1 Übertragbare Spongiforme Enzephalopathien 159
4.2 Nagetier-übertragbare Zoonose-Erreger 169

5 **Parasiten**

5.1 Echinococcus multilocularis 170
5.2 Neospora caninum 171
5.3 Toxoplasma gondii 172
5.4 Tritrichomonas foetus 172
5.5 Trypanosoma equiperdum 172

6 **Mykoplasmen** 174

7 **Pathophysiologie und Lungenfunktionsdiagnostik** 174

8 **Zellbank und Virusstammhaltung**

8.1 Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin 176

8.2 Virusstammhaltung (Riemser Virusbank) 177

9 **Informatik, Biostatistik, Dokumentation** 178

10 **Behördliche Aufgaben und Diagnostik**

10.1 Zulassungen und Chargenprüfungen 182

10.2 Diagnostische Untersuchungen 183

10.3 Aufgaben im Rahmen des Gentechnikrechts 196

10.4 Stellungnahmen und Berichte 196

10.5 Abgabe von Diagnostika 196

10.6 Referenzlaboratorien 198

V. Organisierte Veranstaltungen 219

VI. Presse- und Öffentlichkeitsarbeit 221

VII. Wissenschaftliche Zusammenarbeit 223

VIII. Veröffentlichungen 229

I. Aufgaben

Das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI) ist eine selbständige Bundesoberbehörde im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Es ist in acht Institute gegliedert. Vier Institute sind am Hauptsitz Insel Riems, Mecklenburg-Vorpommern (Molekularbiologie, Infektionsmedizin, Virusdiagnostik, neue und neuartige Tierseuchenerreger), zwei Institute in Jena, Thüringen (bakterielle Infektionen und Zoonosen, molekulare Pathogenese), ein Institut in Tübingen, Baden-Württemberg (Immunologie) und ein Institut in Wusterhausen, Brandenburg (Epidemiologie) angesiedelt. Die Gesamtzahl der Beschäftigten beträgt ca. 500, davon ca. 110 Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler auf Planstellen zuzüglich etwa 30 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter auf befristeten Drittmittelstellen. Der Jahreshaushalt beläuft sich ohne Drittmittel auf etwa 15 Millionen Euro.

Die Aufgaben des FLI sind in § 4 des Tierseuchengesetzes, in § 14 der Tierimpfstoff-Verordnung 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. Darüber hinaus führt das Institut epidemiologische Untersuchungen bei Tierseuchenausbrüchen durch. Außerdem wirkt es bei der Untersuchung von Tieren oder tierischen Erzeugnissen mit, die zur Ein- oder Ausfuhr bestimmt sind.
Der gesetzliche Auftrag zur Forschung auf dem Gebiet der Tierseuchen am FLI umfasst nach der Definition des Tierseuchengesetzes ausdrücklich auch Zoonosen, die beim Tier keine Erkrankungen verursachen. Das Institut übt die Funktion eines nationalen Referenzlabors für anzeigepflichtige Tierseuchen aus sowie die eines gemeinschaftlichen und nationalen Referenzlabors, soweit es hierzu benannt ist. Als Referenzlabors obliegt es dem FLI, durch Ringversuche oder ähnliche Maßnahmen eine Qualitätssicherung in der Tierseuchendiagnostik vorzunehmen. Im Rahmen dieser Tätigkeit veröffentlicht das FLI eine Sammlung amtlicher Verfahren zur Probennahme und Untersuchung auf anzeigepflichtige Tierseuchen sowie den Tiergesundheitsjahresbericht.

Derzeit arbeiten am FLI mehr als 40 nationale Referenzlaboratorien für anzeigepflichtige Tierseuchen sowie mehrere OIE-Referenzlaboratorien (Enzootische Rinderleukose, Tollwut, Aviäre Influenza, Newcastle Disease, Brucellose und bovine Herpesvirus 1-Infektion) und ein WHO-Collaborating Centre für Tollwut. Seit Mai 2006 ist das FLI darüber hinaus Collaborating Centre for Zoonoses in Europe der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE). Dies zeigt bereits die zunehmend international ausgerichtete Tätigkeit des FLI. Derzeit werden im Rahmen von Kooperationsverträgen ausgewählte Aufgaben nationaler Referenzlaboratorien für die Slowakei, Luxemburg und Polen vom FLI ausgeübt. Im Rahmen der Erweiterung der EU war das FLI insbesondere im Rahmen einer Reihe von Twinning Projekten in den neuen Mitgliedsstaaten tätig, zu denen besonders in Osteuropa traditionell gute Kontakte bestehen.

Das internationale Mandat des FLI soll in Zukunft in Kooperation mit der OIE sowie der Welternährungsorganisation FAO weiter ausgebaut werden.

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, Blauzungenkrankheit und Lungenseuche der Rinder. Außerdem fungiert das FLI als Zulassungsstelle für 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 tätig bei der Fortschreibung des Gentechnikrechtes sowie allgemeinen Fragen der biologischen Sicherheit, soweit Tierseuchenerreger betroffen sind.

II. Überblick

Organisation

Hauptsitz Insel Riems

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Boddenblick 5a
17493 Greifswald-Insel Riems
Tel.: (038351) 7-0
Fax: (038351) 7-219, 7-151, 7-226

Institut für Molekularbiologie
Institut für Virusdiagnostik
Institut für Infektionsmedizin
Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. Th. C. Mettenleiter
Vertreter im Amt: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. F.J. Conraths
Persönlicher Referent des Präsidenten: PD Dr. Dr. med. vet. Th. W. Vahlenkamp
Referentin für Presse- und Öffentlichkeitsarbeit: E. Reinking
Verwaltungsleiter: Regierungsdirektor D. Nobis

Standort Jena

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Naumburger Str. 96a
07743 Jena
Tel.: (03641) 804-0
Fax: (03641) 804-228, 804-350

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
Institut für molekulare Pathogenese

Örtl. admin. Vertreter des Präsidenten: Dr. rer. nat. K. Sachse (bis 04/06)
PD Dr. H. Neubauer (seit 05/06)

Örtl. Verwaltungsleiter: T. Honnef

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: Direktor und Professor Prof. Dr. med. vet. L. Stitz
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: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. F.J. Conraths
Örtl. Verwaltungsleiterin: Regierungsamtfrau B. Krause

Die Institute

Institut für Molekularbiologie (IMB)

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. Th. C. Mettenleiter
Vertretung: Direktor und Professor Dr. rer. nat. G. Keil

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dipl.-Biochem. N. Basler (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 12/2006), Dipl.-Biol. S. Böttcher (DFG, teilzeitbesch.), Tierärztin D. Deckers (teilzeitbesch., seit 10/2006), PD Dr. rer. nat. S. Finke (seit 09/2006), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. W. Fuchs, Dipl.-Biol. S. Gentner (DFG, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. M. Giese (teilzeitbesch., seit 11/2006), Dipl.-Biol. C. Höhle (teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. A. Karger, Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. B. Klupp, Dipl.-Biol. M. Krautwald (DFG, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. D. Kühnel (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl.-Humanbiol. J. Kuhn (teilzeitbesch., seit 04/2006), Dipl.-Biol. T. Leege (DFG, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. T. Letzel (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 09/2006), Dipl.-Biol. C. Luig (teilzeitbesch., seit 11/2006), Dipl.-Ing. (FH) K. Michael (DFG, teilzeitbesch.), Wiss. Direktor PD Dr. med. vet. E. Mundt (bis 07/2006), Dr. rer. nat. I. Reimann, Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. A. Römer-Oberdörfer, Tierärztin D. Schröer (teilzeitbesch., seit 10/2006), Dr. rer. nat. J. Stech (seit 11/2006), Dr. rer. nat. O. Stech (seit 11/2006), Dipl.-Humanbiol. E. Topfstedt (teilzeitbesch., seit 10/2006), Wiss. Rat PD Dr. Dr. med. vet. T.W. Vahlenkamp, Dr. med. vet. J. Veits, Dr. rer. nat. S. Weber, Tierärztin D. Wiesner (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 06/2006).

Volontäre:

M. Czech, S. Döhne, E. Jablonski, E. Jenkins, M. Kloos, F. Leipold, S. Lerche, B. Möhl, J. Orbanz, A. Sadowski, M. Skiba, R. Spließ, E. Topfstedt, A. Wegelt, K. Vogt

Forschung und behördliche Aufgaben:

Das **Institut für Molekularbiologie** befasst sich mit der Charakterisierung und molekularen Analyse tierpathogener Viren, wobei vorrangig animale Herpesviren (Pseudorabiesvirus, Bovines Herpesvirus 1, Virus der infektiösen Laryngotracheitis, Koi-Herpesvirus), Rhabdoviren (Tollwut- und Tollwut-verwandte Viren), Orthomyxoviren (aviäre Influenza), Paramyxoviren (Newcastle Disease Virus) sowie Flaviviren (Virus der bovinen Diarrhöe, Virus der klassischen Schweinepest) bearbeitet werden. Mittels molekularvirologischer und zellbiologischer Techniken, die auch die Proteomanalyse beinhalten, werden Untersuchungen zur Genomstruktur und Genregulation sowie zur funktionellen Charakterisierung viraler Genprodukte durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liefern die Basis für die gentechnische Entwicklung von Impfstoffen und diagnostischen Verfahren.

Institut für Virusdiagnostik (IVD)

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. M. Beer
Vertretung: Direktor und Professor Dr. med. vet. H. Schirrmeier

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Tierärztin K. Brehm (teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. M. Dauber, Wiss. Direktor Dr. med. vet. K.R. Depner, Dr. rer. nat. M. Durban, Dr. med. vet. S. Fereidouni (Drittmittel, seit 10/06), Dr. med. vet. A. Gall (Drittmittel), Tierärztin A. Globig (Drittmittel), PD Dr. med. vet. C. Grund (seit 09/06), Wiss. Direktor Dr. med. vet. B. Haas, PD Dr. med. vet. T. Harder, Tierärztin R. Häuslaigner (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 09/06), Dr. med. vet. B. Hoffmann, Dr. rer. nat. D. Höper (Drittmittel, seit 10/06), Tierärztin D. Kalthoff (Drittmittel), Dr. med. vet. P. König, Dipl.-Biol. K. Kühn (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. K. Mischkale (Drittmittel, teilzeitbesch.); Tierärztin M. Rudolf (Drittmittel, seit 08/06), Dipl.-Chem. E. Starick, Dipl.-Chem. H.-G. Strebelow, Dr. rer. nat. K. Utke (Drittmittel, seit 07/06), Tierärztin R. Wäckerlin (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 09/06), Dipl.-Biol. A. Wegelt (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 10/06), Wiss. Direktorin Dr. O. Werner, Tierärztin J. Zemke (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 09/06)

Volontäre:

D. Jung, C. Kaiser, J. Kuhl, I. Müller, C. Rudolf, S. Schütze, T. Winter

Forschung und behördliche Aufgaben:

Im **Institut für Virusdiagnostik** werden veterinärmedizinisch bedeutsame Viruserkrankungen bei Nutztieren schwerpunktmäßig aus diagnostischer und differenzialdiagnostischer Sicht bearbeitet. Besonderes Augenmerk wird dabei auf anzeigepflichtige Tierseuchen gelegt. So sind im Institut nach ISO/IEC 17025 akkreditierte Nationale Referenzlaboratorien für Klassische Schweinepest, Geflügelpest, Newcastle Disease, Infektionen mit Bovinem Herpesvirus Typ 1, Infektiöse Anämie der Einhufer, Teschener Krankheit, Maul- und Klauenseuche, Vesikuläre Schweinekrankheit und Afrikanische Schweinepest, das Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhöe/Mucosal Disease wie auch Referenzlabore für exotische Tierseuchen wie Orbivirusinfektionen oder Rinderpest angesiedelt. Ihnen obliegt neben überwiegend anwendungsorientierten Forschungsaufgaben die Wahrnehmung amtlicher und hoheitlicher Aufgaben entsprechend nationaler und europäischer Gesetzgebung. Die Laboratorien für Geflügelpest, Newcastle Disease und BHV-1 sind zudem als OIE Referenzstellen anerkannt. Im Institut werden Verfahren für die Diagnose virusbedingter Tierkrankheiten erarbeitet, verbessert und validiert, Zulassungsuntersuchungen von Diagnostika entsprechend Tierseuchengesetz vorgenommen sowie kommerziell nicht verfügbare Labordiagnostika entwickelt und bereitgestellt. Zudem wird Prophylaxe- und Pathogeneseforschung für ausgewählte, am Institut für Virusdiagnostik bearbeitete Erreger, betrieben. Der im Institut etablierten Virusbank obliegt die Sammlung, Charakterisierung und Pflege von authentischen Virusstämmen und homologen Antiseren. Ein weiterer Schwerpunkt des Instituts liegt in der Herstellung monoklonaler Antikörper.

Institut für Infektionsmedizin (IMED)

Leitung: Direktor und Professor Dr. med. vet. habil. V. Kaden
Vertretung: Direktor und Professor Prof. Dr. med. vet. J.P. Teifke

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Oberrat Dr. med. vet. S.M. Bergmann, Dr. rer. nat. U. Blohm (seit 06/2006), Tierärztin A. Faust (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin I. von Felbert (Drittmittel, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. U. Fischer, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. D. Fichtner, Wiss. Direktor Dr. rer. nat. habil. H. Granzow, Dr. med. vet. R. Klopfleisch, Dr. rer. nat. H. Kock (Drittmittel), Dr. rer. nat. B. Köllner, Dipl.-Vet.-Med. G. Kotterba, Wiss. Oberrätin Dr. med. vet. E. Lange, Dipl.-Biol. M. Lenk, Dipl.-Vet.-Med. U. Polster, Dr. med. vet. R. Riebe, Tierärztin M. Riechardt (Drittmittel, teilzeitbesch.) Tierärztin K. Saenger (Drittmittel, teilzeitbesch. bis 03/2006), Tierärztin D. Schrudde (Drittmittel, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. H. Schütze, Dipl.-Biol. P. Stumpf (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. C. Winkler (Drittmittel, teilzeitbesch. seit 10/2006)

Volontäre:

K. Bonitz, C. Lany, A. Jandrausch, A. Riefenstahl, G. Karsten, F. Hansmann, V. Kirsipinn, J. Sörries, F. Aeffner, B. Waterkotte, A. Breithaupt, F. Leonardt

Forschung und behördliche Aufgaben:

Das **Institut für Infektionsmedizin** betreibt angewandte Forschung zur Ätiologie und Pathogenese viral, bakteriell und multifaktoriell bedingter Krankheiten der Tiere mit dem Ziel der Entwicklung immunprophylaktischer Maßnahmen und der Ausarbeitung von Bekämpfungsstrategien. Zur Aufklärung von Erreger-Wirtstier-Beziehungen, d.h. des Infektions- und Krankheitsablaufes im Tier, finden virologische, bakteriologische, molekularbiologische, immunologische sowie nach tierexperimentellen Studien auch pathomorphologische und molekularpathologische Methoden in Verbindung mit der elektronenmikroskopischen Analyse von Ultrastrukturen Anwendung. Von aktueller Relevanz sind Untersuchungen zur Immunprophylaxe und Pathogenese der Klassischen Schweinepest bei Wild- und Hausschweinen, zur Diagnostik und Bekämpfung virusbedingter Fischkrankheiten sowie zur Immunologie von Nutzfischen. In Zusammenarbeit mit anderen Instituten des FLI werden Studien zur molekularen Diagnostik und Pathogenese der Klassischen Geflügelpest und Newcastle Disease unter besonderer Berücksichtigung des hämorrhagischen Syndroms, zur Immunpathologie boviner Retrovirusinfektionen, zur Neuropathologie animaler Herpesviren sowie zur Pathogenese und Immunprophylaxe der Maul- und Klauenseuche durchgeführt. Multifaktoriell bedingte Infektionskrankheiten (Faktorenkrankheiten) werden beim Schwein sowie bei Nutzfischen untersucht. Das Institut betreibt eine Zellbank, die relevante Zelllinien für die veterinärmedizinische Forschung und Diagnostik entwickelt, charakterisiert und für das FLI sowie für andere nationale und internationale Institutionen bereitstellt. Im Institut sind die Nationalen Referenzlaboratorien für Infektiöse Hämatopoetische Nekrose und Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden, für Infektiöse Anämie der Lachse und Koi-Herpesvirusinfektion sowie das Nationale Referenzlabor für Muschelkrankheiten angesiedelt, ebenso die Versuchstierhaltung. Zu den weiteren behördlichen Aufgaben gehören u.a. die Mitwirkung bei der Diagnose viraler und bakteriell bedingter Infektionskrankheiten sowie die Beratung von Behörden und Verbänden im Rahmen der Bekämpfung und Diagnostik von Infektionskrankheiten der Tiere.

Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger (INNT)

Leitung: Direktor und Professor Prof. Dr. med. vet. M.H. Groschup
Vertretung: Wiss. Oberrätin Dr. med. vet. A. Buschmann

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Tierärztin M. Angermann (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 02/06), Dr. rer. nat. A. Brenn (Drittmittel), Dr. rer. nat. M. Eiden, Tierärztin I. Dworog (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 04/06), Tierärztin A. Gretzschel (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 02/06), Tierärztin C. Hoffmann (Drittmittel), Tierarzt M. Kaatz, (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 02/06), Dr. rer. nat. M. Keller, Tierärztin L. Kupfer (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 07/06), Tierärztin F. Leidel (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 02/06), Dipl.-Biol. M. Mertens (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 02/06), Tierärztin A. Oelschlegel (Drittmittel), Dipl.-Biol. J. Proft (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin C. Reckzeh (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 04/06), Dr. rer. nat R. Ulrich, Dr. rer. nat. G. Wachlin (Drittmittel, bis 06/06), Dr. med. vet. A. Weber, Dr. med. vet. U. Ziegler

Volontäre:

M. Franz, A. Gretzschel, K. Klinger, M. Kloos, L. Kupfer, N. Lange, C. Reckzeh, M. Schlegel, J. Straube, G. Streege, N. Strychalski, Dr. G. Wachlin

Forschung und behördliche Aufgaben:

Das **Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger** nimmt die Aufgaben des nationalen Referenzlabors (NRL) für die BSE- und Scrapie-Diagnostik wahr. Das bedeutet, dass alle im BSE-Schnelltest auftretenden Verdachtsfälle durch das NRL gemäß den OIE-Richtlinien und der EU-Gesetzgebung (EU-Entscheidung 999/2001) überprüft werden. Daneben erfolgt die Zulassung von BSE-Schnelltests und die fortlaufende Chargenkontrolle und Chargenfreigabe dieser Schnelltests.
Im Bereich der Forschung befasst sich das INNT mit der Entwicklung neuer Nachweismethoden für TSE-Erreger und der Erregerstamm-Differenzierung. Es wurden transgene Mausmodelle zur Analyse der Übertragbarkeit über Speziesgrenzen hinweg sowie zur Bedeutung der Glykosylierung des Prion-Proteins entwickelt. Die Untersuchungen zu den bei der Prion-Umfaltung beteiligten Domänen in Scrapie-infizierten Zellkulturen bzw. zellfreien Systemen stellen weitere Systeme zur Beantwortung dieser Fragestellung dar. Das Institut führt eine BSE-Pathogenesestudie durch und beherbergt die nationale BSE-Probenbank (Teil der nationalen TSE-Plattform), um anderen deutschen TSE-Arbeitsgruppen auf Anfrage und in Abstimmung mit der Forschungsplattform geeignete BSE-Proben zur Verfügung zu stellen.
Neben TSE-Erkrankungen werden neue Infektionskrankheiten („emerging diseases“) bearbeitet, wie Nipah-, Hendra-, Hanta-, West-Nile- und die Pferdeenzephalitis-Virus-Infektionen. Da diese Arbeiten teilweise höhere Sicherheitsstufen (L3, L4) erfordern, müssen die Untersuchungen vorerst auf biochemische und molekularbiologische Fragestellungen und auf die Etablierung diagnostischer Nachweisverfahren beschränkt bleiben.

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen (IBIZ)

Leitung: Dr. rer. nat. K. Sachse (komm. Leitung bis 01/06)
Direktor und Professor PD Dr. med. vet. H. Neubauer (seit 02/06)
Vertretung: Dr. med. vet. U. Methner

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dr. med. vet. M. Elschner, Dipl.-Biol. A. Haase (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. rer. nat. I. Hänel, Dr. med. vet. M. Heller, Wiss. Oberrat Dr. H. Hotzel, Dr. med. vet. C. Klaus, Dr. med. vet. F. Melzer, Dr. rer. nat. B. Meyer, Dr. rer. nat. J. Müller, Dr. rer. nat. W. Müller, Dr. med. vet. P. Otto, Tierärztin N. Rammler (teilzeitbesch., seit 07/06), Dr. med. vet. A. Raßbach, Dr. rer. nat. B. Roth (Drittmittel, bis 02/06), Dr. rer. nat. G. Schmoock, Dr. med. vet. C. Seyboldt, Dir. und Prof. PD Dr. habil. J. Süss

Volontäre:

I. Friedelt

Forschung und behördliche Aufgaben:

Das **Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen** betreibt Forschung auf den Gebieten der Ätiologie und Bekämpfung von Infektionskrankheiten der Tiere. In diesem Zusammenhang werden auch Untersuchungen zur Pathogenese, Diagnostik und Epidemiologie dieser Erkrankungen durchgeführt. Ein bedeutender Teil der Arbeiten ist auf Krankheiten und Krankheitserreger ausgerichtet, die, vom Tier stammend, eine direkte oder indirekte Gesundheitsgefährdung für den Menschen darstellen. Das Institut verfolgt aktuelle Entwicklungen in der Tierhaltung und der Bekämpfung von Tierseuchen, um möglichen Gefahren für Tier und Mensch bereits im Vorfeld begegnen zu können. Das Tätigkeitsfeld umfasst vorwiegend durch Bakterien bedingte anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten, sowie Tierkrankheiten mit großer ökonomischer Relevanz und Zoonosen. In die Forschungen werden dabei landwirtschaftliche Nutztiere, Heim- und Zootiere sowie auch Wildtiere einbezogen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten dienen der Entwicklung und Optimierung diagnostischer Verfahren sowie der Erarbeitung von Bekämpfungsstrategien. Im Mittelpunkt der Forschungstätigkeit stehen durch Salmonellen, Campylobacter, Brucellen, Clostridien, Francisellen, Burkholderien und Mykoplasmen bedingte sowie ausgewählte virale Infektionen. Dabei gelten unabhängig vom jeweiligen Erreger folgende allgemeine Arbeitsschwerpunkte: Untersuchungen zur Erregerprävalenz, Charakterisierung von Übertragungswegen und -mechanismen, Fragen der Erregerpersistenz, Aufdeckung von Infektionsketten und epidemiologischen Zusammenhängen mit Hilfe klassischer und molekularer Methoden, zoonotische Bedeutung bestimmter Erreger, Etablierung von Infektionsmodellen, Prüfung therapeutischer Möglichkeiten im Tiermodell. Die Mehrzahl der Forschungsprojekte wird gemeinsam mit dem Institut für molekulare Pathogenese konzipiert und bearbeitet. Hoheitliche Aufgaben wurden insbesondere im Rahmen der Tätigkeit der nationalen Referenzlaboratorien für die nachfolgenden Krankheiten wahrgenommen: Brucellose, kontagiöse equine Metritis, Milzbrand, Rauschbrand, Vibrionenseuche der Rinder, Rotz, Salmonellose der Rinder und durch Zecken übertragene Krankheiten.

Institut für molekulare Pathogenese (IMP)

Leitung: PD Dr. med. vet. habil. P. Reinhold, PhD (komm. Leitung)
Vertretung: Dr. rer. nat. K. Sachse

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dr. rer. nat. A. Berndt, Dr. rer. nat. E. Borrmann, Dipl.-Biol. M. Glaser, (teilzeitbesch.), Dr. rer. nat. J. Gottschaldt, Prof. Dr. med. vet. E. Liebler-Tenorio, PD Dr. med. vet. habil. I. Moser, Tierärztin A. Kneucker (teilzeitbesch., seit 10/06), Dr. med. vet. H. Köhler, Dr. rer. nat. P. Möbius, Dipl.-Biol. J. Pieper (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. rer. nat. E. Schubert, Dr. med. vet. habil. F. Schulze (bis 03/06), Dr. med. vet. L. Sprague (seit 09/06), Dipl.-Ing. E. Thalmann

Volontäre:

R. Bachmann, A. Bagon, K. Bauer, F. Gierke, S. Göllner, C. Jugert, T. Reichel, S. Reißig, C. Schröder, J. Seifert, A. Wilhelm

Bioinformatik:

Dr. rer. nat. R. Diller

Forschung und behördliche Aufgaben:

Das **Institut für molekulare Pathogenese** wurde im Jahre 2006 erneut in seiner Struktur verändert. Schwerpunktthemen der im IMP durchgeführten Forschungs- und Referenztätigkeiten stellen seit August 2006 durch Mykobakterien sowie durch *Chlamydiacae* spp. verursachte Infektionen dar. Dem IMP sind folgende Nationale Referenzlaboratorien (NRL) zugeordnet: NRL Tuberkulose, NRL Paratuberkulose, NRL Psittakose sowie das NRL Beschälseuche. Von den genannten Referenzlaboratorien werden umfangreiche hoheitliche Aufgaben im Sinne der Überwachung sowie der Verbesserung der Diagnostik von anzeigepflichtigen Tierseuchen, meldepflichtigen Tierkrankheiten und Zoonosen auf nationalem und internationalem Niveau wahrgenommen.
Im Mittelpunkt der Forschungstätigkeit aller Arbeitsgruppen des IMP stehen wissenschaftliche Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Infektionserregern und Wirtsorganismen (Erreger-Wirt-Interaktionen) bei der Entstehung und Verbreitung verschiedenster Infektionskrankheiten der Tiere. Dies betrifft nicht nur die o. g. Schwerpunktthemen, sondern weitere Tierkrankheiten mit zoonotischem Potenzial oder großer ökonomischer Relevanz (z. B. Salmonellen-, Mykoplasmen- oder virale Infektionen). Die Grundlage der wissenschaftlichen Kompetenz des Instituts bilden die Arbeitsgruppen „Chlamydien“ und „Mykobakterien“ im gleichen Maße wie die auf den Gebieten Immunologie (Schwerpunkt Geflügel), Pathologie/Histologie und Klinische Physiologie/Pathophysiologie tätigen Arbeitsgruppen unter Einbeziehung einer soliden tierexperimentellen Basis. Das Kompetenzprofil der einzelnen Arbeitsgruppen ist dadurch charakterisiert, dass die für jede Arbeitsgruppe spezifischen Methoden und Arbeitstechniken dem nationalen und internationalen Stand entsprechend erhalten und weiterentwickelt werden. Die Forschungstätigkeiten zur Pathogenese, die meist in Kooperation mit dem Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen (IBIZ) durchgeführt werden, sind essentielle Grundlage zur Erarbeitung verbesserter Strategien zur Diagnostik, Prophylaxe und effektiven Bekämpfung der Infektionskrankheiten bei Tieren sowie zum Schutze des Menschen.

Institut für Immunologie (IfI)

Leitung: Direktor und Professor Prof. Dr. med. vet. L. Stitz
Vertretung: Direktor und Professor Prof. Dr. rer. nat. E. Pfaff

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dipl.-Biol. A. Baumgartner (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. I. Bintintan (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 04/2006), Dr. Dipl. Biol. S. Bourteele (Drittmittel), Dipl.-Biol. K. Dröbner (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 04/2006), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. P.-J. Enzmann, PD Dr. rer. nat. M. Knittler (seit 05/2006), Dipl. Biol. C. Luttermann (DFG, teilzeitbesch.), Wiss. Dir. Prof. Dr. rer. nat. G. Meyers, Dr. rer. nat. K. Muschko (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin S. Nebrich (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl. Biol. B. Petsch (Drittmittel, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat Prof. Dr. rer. nat. O. Planz, Wiss. Dir. Dr. rer. nat. H.-J. Rziha, Tierärztin E.-M. Schürmann (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. rer. nat. B. A. Tews (Drittmittel), Dr. med. vet. H. Voigt

Volontäre:

A. Grabowska, C. Kienzle, P. Mollenkopf, V. Niemann, J. Rohde, N. Schedel, M. Schöffler

Forschung und behördliche Aufgaben:

Am **Institut für Immunologie** wird Forschung zu immunologischen Mechanismen bei virusbedingten Tierseuchen betrieben. Für die Diagnose viraler Tierseuchen werden immunologische und molekularbiologische Methoden entwickelt und verbessert. Auch für die Risikoabschätzung bei der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen schaffen begleitende Forschungsarbeiten zur Molekularbiologie von Viren die wissenschaftlichen Grundlagen. Zur Verbesserung und Entwicklung neuer Bekämpfungs- und Kontrollstrategien auf immunologischer Grundlage werden molekularbiologische Untersuchungen an verschiedenen Viren durchgeführt. Diese Untersuchungen mit dem Ziel, rekombinante Viren als Lebendvakzine einzusetzen, erstrecken sich auf Pestiviren (Virus der klassischen Schweinepest; Virus der bovinen Virusdiarrhoe), Caliciviren (Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche), Herpesviren (Pseudorabiesvirus), Parapockenviren sowie Fischrhabdoviren. Hierzu ist die Erforschung der biochemischen Grundlagen der Virusvermehrung und der molekularen Mechanismen der Interaktion von Virus und Immunsystem notwendig. Insbesondere aus den Arbeiten zur Attenuierung von Pestiviren und zum Einsatz des Parapockenvirus als Vektor aufgrund seiner immunstimulierenden Eigenschaften ergeben sich neue Aspekte für die Verwendung als Impfstoffe. Die immunologischen Arbeiten des Instituts dienen der Aufklärung der zellulären und humoralen Immunantwort nach Virusinfektionen. Auf zellbiologischer Ebene werden sowohl die für eine effiziente Immunantwort relevanten Signalwege als auch die Mechanismen der Antigenprozessierung zur MHC-vermittelten Präsentation der viralen Antigene untersucht. Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sollen zur Verbesserung der Effizienz von Virusimpfstoffen eingesetzt werden. Arbeiten zur Interaktion zwischen Viren und Immunzellen sollen immunpathologische Vorgänge auf B- und T-Zellebene bei Virusinfektionen aufklären. Als Modell einer T-zellvermittelten immunpathologischen Erkrankung wird die Bornasche Krankheit untersucht, wobei insbesondere protektive Wirkungen einer frühen Induktion der humoralen und zellulären Immunantwort untersucht werden, die entzündlich-degenerative Veränderungen im Gehirn und damit die Erkrankung verhindern können. Immunologische und zellbiologische Untersuchungen zu transmissiblen spongiformen Enzephalopathien sollen sowohl pathologische Mechanismen weiter abklären als auch Wege einer möglichen Intervention bei diesen degenerativen Gehirnerkrankungen aufzeigen. Schwerpunkte der Forschung über Fischviren sind die molekulare Epidemiologie fischpathogener Rhabdoviren sowie die Entwicklung von Impfstoffen.

Institut für Epidemiologie (IfE)

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. F.J. Conraths
Vertretung: Direktor und Professor Dr. med. vet. M. Kramer

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Oberrat Dr. med. vet. A. Aschfalk (seit 06/2006), Dr. med. vet. D. Beier, Dr. med. vet. H. Enbergs (Drittmittel, seit 09/2006), Tierarzt C. Freuling (Drittmittel), Dr. rer. nat. A. Fröhlich, Dr. med. vet. J.M. Gethmann (seit 09/2006), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. L. Geue, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. K. Henning, Dipl.-Ing. A. Micklich, Wiss. Dir. Dr. med. vet. T. Müller, Dr. med. vet. C.J. Pötzsch (bis 05/2006), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. G. Schares, Wiss. Oberrat PD Dr. agr. T. Selhorst, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. C. Staubach, Wiss. Oberrat Dr. agr. J. Teuffert, Dr. med. vet. F. Unger, J. Vesely (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin K. Wiedl (Drittmittel), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. M. Ziller

Volontäre:

Tierarzt M. Granzow, Dr. Morteza Hoseini Nejad, Tierarzt J. Meyer, Arzt J. Schmidt, Tierärztin K. Wiedl, Tierärztin M. Zimmermann

Forschung und behördliche Aufgaben:

Das **Institut für Epidemiologie** beschäftigt sich mit der Epidemiologie einheimischer Tierseuchen (z.B. aviäre Influenza, BSE, Klassische Schweinepest, Tollwut), der Prävention nicht einheimischer Infektionskrankheiten (Risikobewertungen, Frühwarnsysteme) und den biomathematischen und epidemiologischen Grundlagen der Risikobewertung. Mit modernen epidemiologischen Methoden, die auch auf mathematische Modelle und geografische 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 Expert System (TRACES) der Europäischen Union, und beteiligt sich an der Entwicklung elektronischer Werkzeuge des Krisenmanagements im Falle von Tierseuchenausbrüchen. Arbeitsgruppen, die unter Anwendung von labordiagnostischen Untersuchungen tätig sind, führen epidemiologische Studien durch. Die Evaluierung von Diagnoseverfahren für epidemiologische Zwecke sowie die Übernahme von Referenzfunktionen auf nationalem und internationalem Niveau bilden dabei eine wichtige Voraussetzung für eine optimale Validität der Studienergebnisse. Zu den Forschungsschwerpunkten gehören Tierseuchen, aber auch andere Tierkrankheiten mit wirtschaftlicher und/oder zoonotischer Bedeutung, beispielsweise Q-Fieber, Chlamydiose, Salmonellose, Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli*, Toxoplasmose, Neosporose, Echinokokkose. Die Reservoirfunktion verschiedener Tierpopulationen für Tierseuchenerreger und wirtschaftlich bedeutsame Erkrankungen von Haustieren wird untersucht.

Beschäftigte und Organigramm

Übersicht über vorhandene Personalstellen

Stand 31.12.2006

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler				Angestellte (ohne Verwaltungspersonal)				Arbeiter				Verwaltungspersonal	Gesamt
	a	B	c	ges.	A	b	c	ges.	a	b	c	ges.		
Insel Riems														
1. Leitung u. zentrale Dienste einschließlich Zulassungsstelle	8	4		12	5	1		6					2	18
2. Institut für Molekularbiologie	11	3,5	5	19,5	13			13	2			2		34,5
3. Institut für Virusdiagnostik	12	9		21	11	4		15	2	1		3		39
4. Institut für Infektionsmedizin	15	4,5	1	20,5	15	1		16	3	1		4		40,5
5. Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger	6,5	10		16,5	6	3		9	1	4,5		5,5		31
6. Gemeinsch. Einrichtungen														
a) Bibliothek					1			1						1
b) Versuchstierhaltung									17			17		17
c) Zentrallager/Nährmedien					2			2	1			1		3
d) Fotolabor					2			2						2
7. Betriebstechnischer Dienst					6			6	31			31		37
8. Hauptverwaltung									13			13	26,50	39,50
Tübingen														
1. Sekretariat													1	1
2. Institut für Immunologie	8	4		12	13	3		16	5			5		33
3. Gemeinsch. Einrichtungen														
a) Informationszentrum					2			2						2
b) Bibliothek					1			1						1
c) Werkstätten					2			2	11			11		13
d) Versuchstierhaltung					1			1	9			9		10
e) Zentrallager/Nährmedien					1			1						1
f) Fotolabor					1			1						1
4. Örtliche Verwaltung und Betriebstechnischer Dienst					3			3	8			8	7	18
Wusterhausen														
1. Sekretariat													2	2
2. Institut für Epidemiologie	17	3		20	12,5	2,5		15						34,5
3. Gemeinsch. Einrichtungen														
a) Bibliothek					1			1						1
b) Versuchstierhaltung									4			4		4
c) Nährmedienherstellung					1			1						1
d) Fotolabor					1			1						1
4. Betriebstechnischer Dienst					1			1	4			4		5
6. Örtliche Verwaltung									4			4	3,75	7,75

a) = aus Hausmitteln b) = aus Zuwendung Dritter und von Bundesbehörden c) = aus DFG-Mitteln

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler				Angestellte (ohne Verwaltungspersonal)				Arbeiter				Verwalt. personal	Gesamt
	a	B	c	ges.	A	b	c	ges.	a	b	c	ges.		
Jena														
1. Sekretariat													2	2
2. Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen	15	3		18	14,75	2		16,75	3			3		37,75
3. Institut für molekulare Pathogenese	14	1		15	21,5	0,5		22	1			1		38
4. Gemeinsch. Einrichtungen														
a) Imformationszentrum	1			1	2			2						3
b) Bibliothek					1			1						1
c) Versuchstierhaltung									9			9		9
d) Zentrallager/Nährmedien					1			1	3			3		4
e) Fotolabor					1									1
5. Betriebstechnischer Dienst					1			1	6			6		7
6. Örtliche Verwaltung									4			4	5	9
Gesamt	107,5	42	6	155,5	142,75	17	0	159,75	141	6,5	0	147,5	49,25	512

a) = aus Hausmitteln b) = aus Zuwendung Dritter und von Bundesbehörden c) = aus DFG-Mitteln

III. Ausgewählte Schwerpunktthemen

Institut für Molekularbiologie:
Markervakzinen gegen aviäre Influenza

Veits, J.*, Fuchs, W., Mettenleiter, T.C. und Römer-Oberdörfer, A.

Das derzeitige, durch hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) vom Serotyp H5N1 verursachte Seuchengeschehen hat in weiten Teilen der Welt zu hohen Verlusten beim Geflügel und bisher zu mehr als 150 Todesfällen bei Menschen geführt. Daher wird in vielen Ländern eine prophylaktische Impfung gegen aviäre Influenza beim Wirtschaftsgeflügel bereits eingesetzt oder in Betracht gezogen.
Grundsätzlich können Tiere durch Impfung wirksam vor den Symptomen der oft als Vogelgrippe bezeichneten klassischen Geflügelpest geschützt werden. Hierfür werden bislang vorwiegend inaktivierte Influenzaviren eingesetzt, da die Verwendung gering pathogener AIV-Isolate als Lebendimpfstoff aufgrund der hohen Mutationsraten dieser Viren zu riskant wäre. Durch Immunisierung können die Tiere zwar vor klinischer Erkrankung geschützt werden, ein sicherer Schutz vor Infektion (sterile Immunität) wird jedoch nicht erreicht. Eine Impfung birgt somit die Gefahr einer unerkannten Zirkulation des Seuchenvirus in der Geflügelpopulation oder anderer Influenzaviren, die zu hochpathogenen Varianten mutieren können (Smith et al., 2006).
Deshalb wurden Impfstoffe entwickelt, die eine Unterscheidung zwischen geimpften und mit Feldvirus infizierten Tieren erlauben. Das so genannte DIVA („Differentiating Infected from Vaccinated Animals“)-Prinzip hat in der Vergangenheit bereits wesentlich zur Eindämmung verschiedener Tierseuchen, wie zum Beispiel der Aujeszkyschen Krankheit der Schweine, beigetragen (Müller et al., 2003; van Oirschot, 1999). In Italien werden seit einigen Jahren inaktivierte AIV Impfstoffe eingesetzt, die zwar den Hämagglutinin-Subtyp des zu bekämpfenden Feldvirus, aber einen abweichenden Neuraminidase-Subtyp aufweisen (Capua et al., 2002). Folglich können immunisierte von infizierten Tieren durch den Nachweis von Serumantikörpern gegen die verschiedenen Neuraminidase-Subtypen unterschieden werden. Allerdings ist zur Differenzierung ein für Massenuntersuchungen wenig geeigneter, aufwändiger Immunfluoreszenztest nötig. Außerdem kann trotz der Verwendung von Impfviren mit einem relativ seltenen Neuraminidase-Subtyp das Auftreten neuer Feldviren immer wieder zu Differenzierungsproblemen führen.
Zuverlässiger sind in dieser Hinsicht Spaltvakzinen oder Vektorimpfstoffe, die nur einzelne AIV Proteine enthalten oder exprimieren. Am besten ist hierfür das als Hauptimmunogen der Influenzaviren bekannte Hämagglutinin (HA) geeignet, da die in immunisierten Tieren gebildeten HA-spezifischen Antikörper in der Regel ausreichen, um eine schützende Immunität gegen Viren vom gleichen HA-Subtyp zu vermitteln. Durch das Auftreten von Antikörpern gegen weitere Proteine des AIV können Feldvirus-infizierte Tiere erkannt werden.
Als erste Vektorvakzinen wurden attenuierte, HA-exprimierende Geflügelpocken-Viren entwickelt (Taylor et al., 1988), die in Mittelamerika und Ostasien bereits eingesetzt werden. Nachteile dieser Lebendvirus-Impfstoffe sind jedoch, dass sie durch Injektion individuell verabreicht werden müssen und dass in mit herkömmlichen Geflügelpockenimpfstoffen bereits immunisierten Tieren oft kein ausreichender Schutz gegen AIV-Infektionen erreicht wird (Swayne et al., 2000). Deshalb wurden am FLI in den letzten Jahren andere Geflügelviren als Vektoren für die HA-Expression genutzt, wie das Newcastle Disease Virus (NDV) und das Virus der Infektiösen Laryngotracheitis (ILTV), die eine einfache Applikation an große Tierzahlen über Spray oder Trinkwasser erlauben sollten.

AIV HA exprimierende NDV-Rekombinanten

Mit Hilfe eines von uns etablierten reversen genetischen Systems auf der Basis des attenuierten und als Lebendimpfstoff eingesetzten NDV Stamm Clone 30 (Römer-Oberdörfer et al., 1999) wurden verschiedene HA-exprimierende NDV/AIV-Rekombinanten generiert.
Bei einer ersten Rekombinante, NDVH5-A, wurde der für Hämagglutinin des hochpathogenen AIV-Isolates A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) kodierende offene Leserahmen (ORF) in die Region zwischen den für das Fusionsprotein und das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein kodierenden Genen inseriert. Die Transkription des HA ORF wird dabei durch flankierende NDV-spezifische Genstart (GS)- und Genend (GE)-Signale gewährleistet. Allerdings weisen alle Gene des NDV zwischen GS- bzw. GE-Signal und offenem Leserahmen mehr oder weniger umfangreiche nicht-kodierende Regionen auf, deren genaue Funktion noch weitgehend unklar ist. Daher wurde eine zweite Rekombinante, NDVH5-B, generiert, bei

der der HA ORF zusätzlich von nicht-kodierenden Regionen, die denen des NDV HN-Gens entsprechen, flankiert wird (Abb. 1).

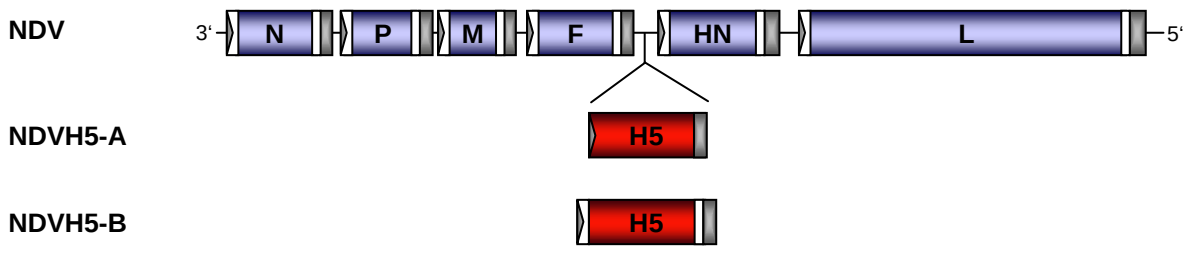
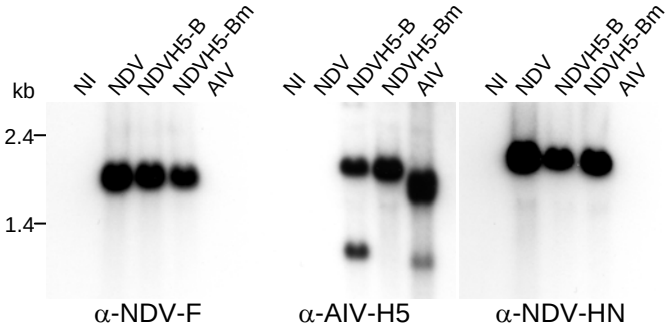


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus HA-exprimierender NDV-Rekombinanten. In NDVH5-A wird der offene Leserahmen des AIV H5 von NDV-spezifischen Genstart-(graue Dreiecke) und Genend-(graue Rechtecke) Signalen flankiert. Die Rekombinante NDVH5-B besitzt zwischen GS- bzw. GE-Signal und H5 ORF zusätzlich nicht-kodierende Regionen (weiße Rechtecke).

Vergleiche der Rekombinanten NDVH5-A und –B zeigten, dass die Insertion nicht-kodierender Regionen um den HA ORF offensichtlich die Expression des HA steigert. In Transkriptionsanalysen wurden in NDVH5-B-infizierten Zellen im Vergleich zur NDVH5-A Infektion stärkere H5 mRNA-Signale detektiert und in Proteinanalysen konnte das H5 Protein nur in NDVH5-B-, aber nicht in NDVH5-A-infizierten Zellen nachgewiesen werden.

Abb. 2*: Northern Blot Analysen von Gesamtzell-RNA aus mit NDV, NDVH5-B, NDVH5-Bm und AIV infizierten bzw. nicht infizierten (NI) Kontrollzellen. Die Hybridisierung erfolgte mit ^{32}P-markierten Gen-spezifischen cRNA-Sonden von NDV-F, AIV-H5 bzw. NDV-HN. Die Größe von Markerproteinen wurde links gekennzeichnet. Um ein übermäßiges Signal im mittleren Blot zu vermeiden, wurde lediglich die 0,3fache Menge an Gesamtzell-RNA AIV-infizierter Zellen aufgetrennt.



In Northern Blot Analysen trat in NDVH5-B infizierten Zellen neben der erwarteten H5 mRNA von ca. 2 kb ein verkleinertes Transkript von ca. 1,1 kb auf (Abb. 2). Sequenzanalysen ergaben, dass innerhalb des H5 ORF ein Sequenzabschnitt mit hoher Homologie zu NDV-spezifischen Transkriptions-Terminationssignalen (GE) vorliegt. Nach Eliminierung dieses Motivs durch Mutagenese und Analyse der daraus resultierenden Rekombinanten NDVH5-Bm konnte gezeigt werden, dass diese GE-ähnliche Sequenz einen vorzeitigen Abbruch der Transkription bedingte. In Zellen, die mit der Rekombinante NDVH5-Bm infiziert worden waren, wurden in Northern Blot Analysen folglich ausschließlich H5 Transkripte erwarteter Größe detektiert (Abb. 2).
In Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen infizierter Zellen zeigte sich nach Eliminierung des Terminations-ähnlichen Signals eine Steigerung der H5 Proteinexpression im Vergleich zur originären Rekombinante NDVH5-B (Abb. 3 und 4).
Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass das AIV H5 Protein in die Virionen der rekombinanten NDV inkorporiert wird (Abb. 5). Mit einem AIV H5-spezifischen Antiserum wurde die Oberfläche der NDVH5-B und NDVH5-Bm Virionen markiert (Abb. 5D und F), was für einen Einbau des AIV H5 Proteins in die Virushülle des NDV spricht.
In einem Tierexperiment wurde die Schutzwirkung von NDVH5-Bm sowohl gegen H5 HPAIV als auch gegen velogenes NDV geprüft. Dazu wurde NDVH5-Bm drei Wochen alten SPF-Hühnern in einer Dosis von $10^{6,0}$ EID_{50}/Tier okulonasal verabreicht. Bereits nach vierzehn Tagen waren bei allen Tieren hohe Antikörpertiter gegen NDV im Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) detektierbar, und auch AIV

H5-spezifische Antikörper waren nach drei Wochen bei fast allen Tieren im HAH nachzuweisen (Abb. 6A).

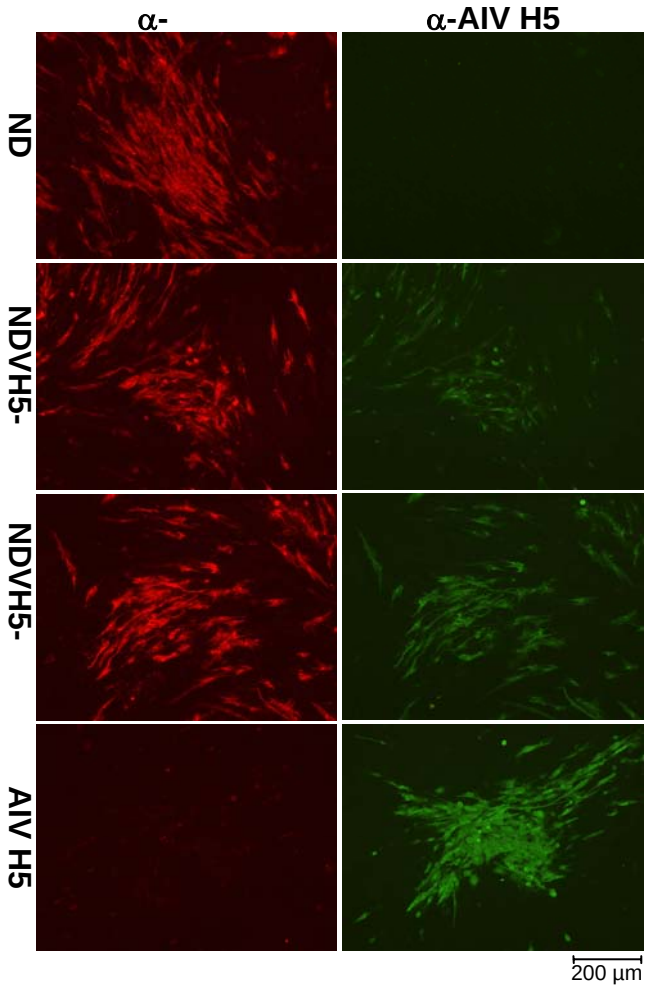


Abb. 3: Indirekte Immunfluoreszenz. Doppelmarkierung von NDV, NDVH5-B, NDVH5-Bm und AIV-infizierten Hühnerfibroblastenzellen mit NDV-spezifischem (rot) und AIVH5-spezifischem Antiserum (grün).

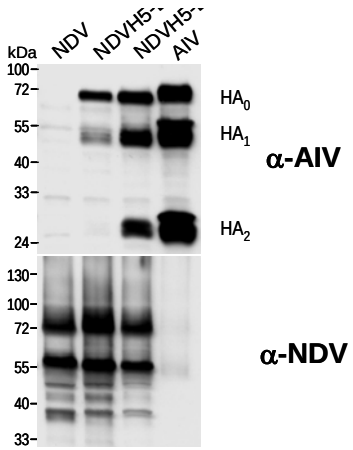


Abb. 4*: Western Blot Analysen. Lysate NDV, NDVH5-B, NDVH5-Bm und AIV-infizierter Zellen wurden mit einem AIV H5-spezifischen (α-AIV) bzw. NDV-spezifischen Antiserum (α-NDV) inkubiert. Die Bindung wurde mit Peroxidase-markierten sekundären Antikörpern und nachfolgender Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Die Größe von Markerproteinen wurde gekennzeichnet.

Im sensitiveren Immunofluoreszenztest zeigte sich, dass bereits nach sieben Tagen bei fast allen Tieren H5-spezifische Antikörper vorhanden waren (Abb. 6A). Eine erste Belastungsinfektion nach drei Wochen ergab, dass eine einmalige Immunisierung die Tiere sowohl vor einer letalen Dosis mit velogenem NDV (Abb. 6B) als auch HPAIV H5N2 (Abb. 6C) schützt. Lediglich sporadisch auftretende milde respiratorische Symptome wurden beobachtet. Nach einer zweiten Immunisierung im Abstand von sechs Wochen waren die Tiere gegen klinische Erkrankung nach Infektion mit HPAIV geschützt, während alle Kontrolltiere innerhalb von vier Tagen starben (Abb. 6D).
Die Seren vor und nach Belastungsinfektion wurden in einem am FLI etablierten ELISA (Starick et al., 2006) zur Detektion von Antikörpern gegen das AIV Nukleoprotein (NP) eingesetzt. Während in den Seren der Tiere vor AIV Belastungsinfektion keine NP Antikörper nachweisbar waren, serokonvertierten alle Tiere innerhalb von drei Wochen nach Belastungsinfektion (Abb. 7).
Damit konnte gezeigt werden, dass mittels eines NP-ELISA immunisierte von virusinfizierten Tieren zuverlässig unterschieden werden können. Darüber hinaus belegen die Daten, dass es möglich ist, immunisierte und nachfolgend Feldvirus-infizierte Tiere zu erkennen.

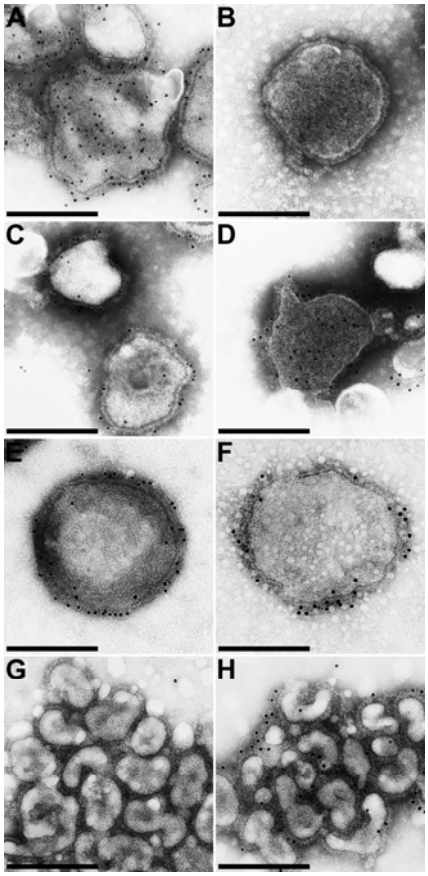


Abb. 5*: Immunelektronenmikroskopie gereinigter Virionen von NDV (A, B), NDVH5-B (C, D), NDVH5-Bm (E, F) und AIV (G, H). Die Bindung von NDV-spezifischem Antiserum (B, D, F, H) wurde mit Gold-markierten sekundären Antikörpern visualisiert. Die Balken entsprechen 250 nm. (Aufnahmen dankenswerterweise von H. Granzow, FLI, zur Verfügung gestellt).

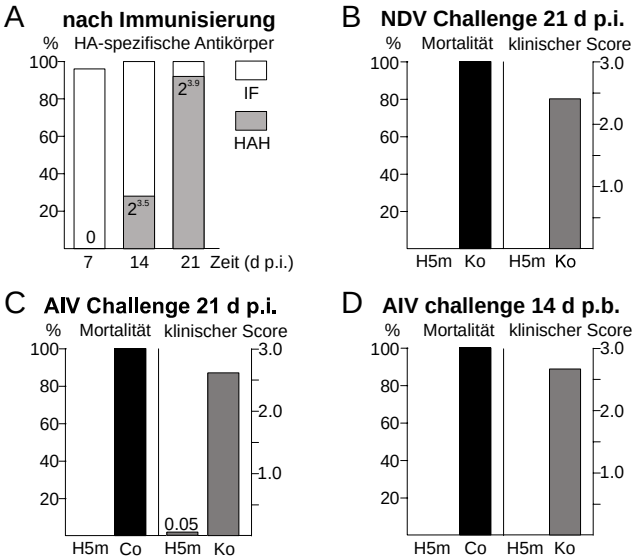


Abb. 6*: (A) Nachweis H5-spezifischer Antikörper im Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) und in der indirekten Immunfluoreszenz (IF) in Seren von Tieren nach einmaliger Immunisierung mit NDVH5-Bm. Die durchschnittlichen HA-spezifischen Antikörpertiter pro Gruppe wurden dargestellt. (B) Mortalitätsraten und klinischer Index von mit NDVH5-Bm immunisierten Kontrolltieren (Ko) nach Belastungsinfektion mit velogenem NDV oder HPAIV H5N2 nach einmaliger (C) bzw. zweimaliger Immunisierung (D). Die Tiere wurden über zehn Tage täglich klinisch kontrolliert und als gesund (0), krank (1), schwer krank (2) oder tot (3) bewertet. Der ermittelte klinische Index spiegelt die durchschnittliche Erkrankung pro Tier und Tag wider.

AIV HA exprimierende ILTV-Rekombinanten

Anders als bei NDV wurde im Falle des aviären Herpesvirus ILTV kein etablierter Impfstamm, sondern ein ursprünglich virulenter Stamm als Vektor verwendet, der zunächst durch gezielte Deletion virulenzdeterminierender Gene abgeschwächt wurde. So entstand durch Entfernung des ILTV-spezifischen UL0 Gens ein praktisch vollkommen apathogenes Virus, während Mutanten, denen das dUTPase-Gen UL50 fehlte, nach intratrachealer Applikation hoher Virusdosen zwar eine gewisse

Restvirulenz zeigten, nach okulärer Verabreichung aber ebenfalls gut verträglich waren (Fuchs et al., 2000; Veits et al., 2003).

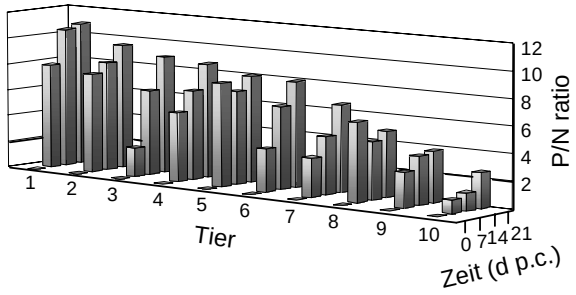


Abb. 7*: Serologische Untersuchung mittels NP-ELISA. Die Seren der Tiere wurden in einem indirekten NP-ELISA untersucht. Der erhaltene P/N-Quotient (OD Probe/OD Negativkontrolle) der Seren zweimal immunisierter Tiere vor sowie 7, 14 und 21 Tage nach AIV Belastungsinfektion (d p.c.) wurde dargestellt. Der cut-off Wert von 2.0 wurde als dickere Linie markiert.

In diese beiden Genloci wurden deshalb die HA-Gene der HPAIV-Isolate A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) bzw. A/chicken/Italy/445/99 (H7N1) inseriert und unter Kontrolle des starken immediate-early Promotors des humanen Zytomegalievirus exprimiert (Abb. 8).

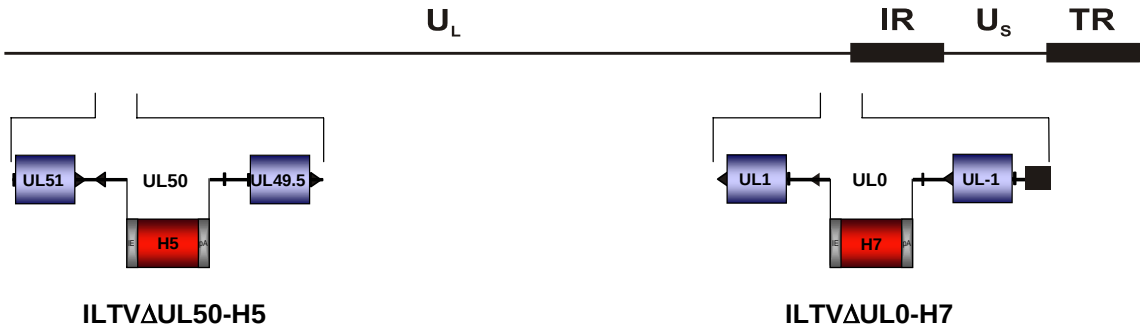


Abb. 8: Aufbau AIV HA-exprimierender ILTV-Rekombinanten. Die Gene UL50 bzw. UL0 wurden deletiert und durch ein H5 (ILTVΔUL50-H5) bzw. H7-Gen (ILTVΔUL0-H7) ersetzt. Die HA Expression wird durch den immediate-early Promotor des humanen Zytomegalievirus und ein Polyadenylierungssignal des SV40 gewährleistet.

Die H5-exprimierende ILTV-Rekombinante ILTVΔUL50-H5 induzierte nach Immunisierung von SPF-Hühnern bei allen Tieren AIV H5-spezifische Antikörper und schützte sowohl gegen nachfolgende Belastungsinfektionen mit homologen oder heterologen hochpathogenen AIV-Isolaten vom Subtyp H5 als auch mit virulentem ILTV (Lüschow et al., 2001). Entsprechend schützte eine H7-exprimierende ILTV-Rekombinante (ILTVΔUL0-H7) gegen nachfolgende Infektionen mit virulentem ILTV oder einer letalen Dosis des homologen HPAIV (Veits et al., 2003). Obwohl die Hühner in diesen Experimenten nach HPAIV-Belastungsinfektion klinisch unauffällig blieben, konnten sie mittels eines NP-ELISAs eindeutig als infiziert erkannt werden (Starick et al., 2006), so dass auch diese ILTV-Rekombinanten als Markerimpfstoffe geeignet sind (Fuchs et al., 2006; Fuchs et al.; 2007).
In einem weiteren Tierversuch wurde die Wirksamkeit von H5-exprimierenden NDV- und ILTV-Rekombinanten mit der einer kommerziell erhältlichen inaktivierten AIV H5 Vakzine verglichen. Dazu wurden sechs Wochen alte SPF-Hühner einmalig mit NDV-H5Bm, ILTVΔUL50-H5 und Nobilis H5N2 (Intervet) immunisiert und nach drei Wochen mit HPAIV vom Subtyp H5N2 belastet. Nach Belastungsinfektion entwickelte keines der immunisierten Tiere klinische Symptome, während alle Kontrolltiere schwer erkrankten und 90 % von ihnen starben (Abb. 9). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in der bis zehn Tage nach Belastungsinfektion in Rachen- und Kloakentupferproben AIV-RNA mittels real-time RT-PCR nachgewiesen werden konnte, war in Tieren, die mit der inaktivierten Vakzine immunisiert worden waren, keine und in mit NDVH5-Bm oder ILTVΔUL50-H5 immunisierten Tieren lediglich eine minimale Virusausscheidung nachweisbar (Abb. 10).

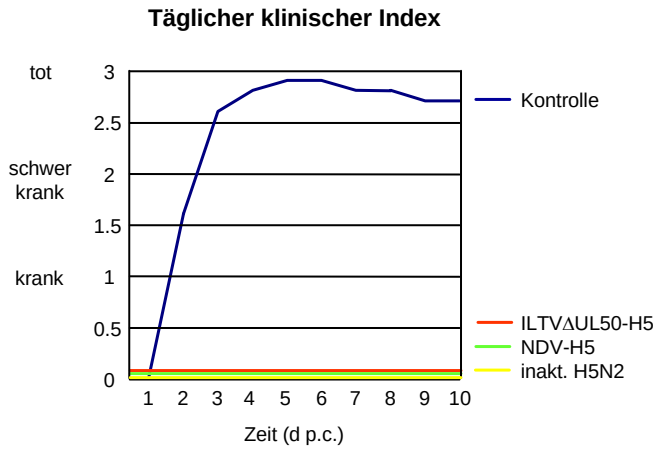


Abb. 9: Immunisierte und naive Hühner wurden über zehn Tage nach AIV-Belastungsinfektion täglich untersucht und als gesund (0), krank (1), schwer krank (2) oder tot (3) bewertet. Daraus wurde ein klinischer Index ermittelt, der die durchschnittliche Erkrankung pro Gruppe und Tag widerspiegelt.

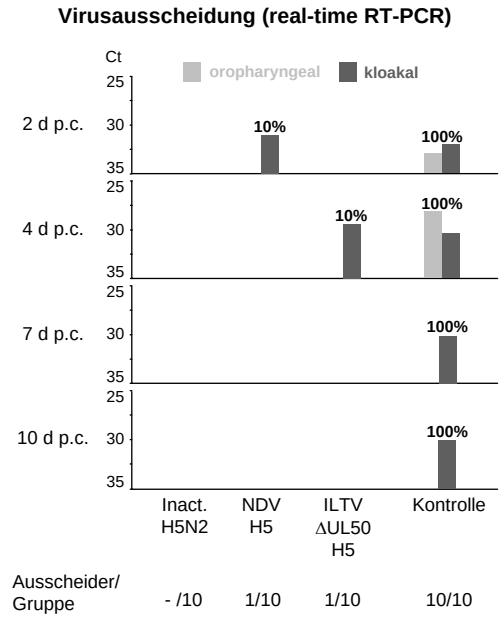


Abb. 10: An den angegebenen Tagen nach AIV-Belastungsinfektion (d p.c.) wurden Rachen- (grau) und Kloakentupfer (schwarz) mittels real-time RT-PCR auf AIV-RNA untersucht. Dargestellt ist die Anzahl positiver Tiere pro Gruppe (%) und die durchschnittlich zum Nachweis erforderliche Anzahl an PCR-Zyklen (Ct) als relatives Maß für die Virusmenge.

Die am FLI hergestellten NDV- und ILTV-Vektorvakzinen schützen somit fast genau so gut gegen die durch HPAIV vom Subtyp H5N2 hervorgerufene klassische Geflügelpest wie eine kommerziell erhältliche und zurzeit in vielen Ländern eingesetzte Vollvirus-Vakzine. Allerdings bleibt zu prüfen, ob die Wirksamkeit der neuen Vakzinen möglicherweise durch eine vorangehende Impfung oder Infektion mit dem Vektorvirus beeinträchtigt wird. Da eine prophylaktische Immunisierung gegen NDV in vielen Ländern üblich ist und in Deutschland sogar Impfpflicht für alle Hühner und Puten besteht, könnten entsprechende Vektorkonstrukte bei Geflügelpestausbrüchen nur bedingt als Notfall-Vakzinen geeignet sein. Auf jeden Fall könnten HA-exprimierende NDV-Rekombinanten aber routinemäßig als bivalente Impfstoffe zur prophylaktischen Immunisierung gegen die klassische und die atypische Geflügelpest eingesetzt werden, da sie gegen beide Erreger einen verlässlichen Schutz vermitteln. Aufgrund des breiten Wirtsspektrums von NDV könnten entsprechende Rekombinanten zur Impfung von zahlreichen Vogelarten und eventuell auch von Säugetieren geeignet sein. Dagegen ist das Wirtsspektrum des ILTV auf Hühner und Fasanen beschränkt. Dies und die Tatsache, dass nur in endemischen Gebieten prophylaktisch gegen die ILT geimpft wird, prädisponiert HA-exprimierende ILTV-Rekombinanten als Notfall-Vakzine, deren ungewollte Ausbreitung über andere Vogelspezies praktisch ausgeschlossen werden kann.

Sowohl NDV- als auch ILTV-Lebendvakzinen sind prinzipiell zur Applikation über Aerosol oder Trinkwasser geeignet, was im Falle einer generellen prophylaktischen Impfung die Verabreichung entsprechender Impfviren an große Tierzahlen erleichtern und im Seuchenfall eine schnelle und wenig

kostenintensive Notfall-Immunisierung akut bedrohter Geflügelbestände ermöglichen sollte. Ob die beschriebenen HA-exprimierenden NDV- und ILTV-Rekombinanten in diesen Applikationsformen einen ausreichenden Schutz aller Tiere gegen hochpathogenes AIV vermitteln, bleibt allerdings noch zu prüfen. Ergänzend zu den HA-exprimierenden Markervakzinen steht mit dem am FLI etablierten ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das relativ hoch konservierte Nukleoprotein von Influenzaviren (Starick et al., 2006) ein zuverlässiges und einfaches Nachweissystem für umfangreiche serologische Kontrolluntersuchungen zur Verfügung, das eine Differenzierung geimpfter und AIV-infizierter Tiere erlaubt und somit die Verfolgung des DIVA-Prinzips bei der Kontrolle der aviären Influenza praktikabel erscheinen lässt. Im Hinblick auf die derzeitige Seuchenlage sollten die Vorteile der neuen Vakzinen und Diagnostika möglichst bald für die Bekämpfung der klassischen Geflügelpest in der Praxis nutzbar gemacht werden, weshalb noch ausstehende Untersuchungen zur Wirksamkeit und Sicherheit der rekombinanten Impfstoffe derzeit zügig vorangetrieben werden.

* Die Abbildungen 2, 4, 5, 6 und 7 wurden aus „Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza“, PNAS 23;103(21):8197-202, mit Genehmigung des Verlags entnommen.

Literatur

Capua, I., C. Terregino, G. Cattoli, F. Mutinelli und J.F. Rodriguez. 2002. Development of DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. Avian Pathol. **32:**47-55.

Fuchs, W., K. Ziemann, J.P. Teifke, O. Werner und T.C. Mettenleiter. 2000. The non-essential UL50 gene of avian infectious laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase which is not a virulence factor. J. Gen. Virol. **81:**627-638.

Fuchs, W., J. Veits und T.C. Mettenleiter. 2006. Recombinant viruses of poultry as vector vaccines against fowl plague. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **119(3-4):**160-166.

Fuchs, W., J. Veits, D. Wiesner, H. Granzow, J.P. Teifke und T.C. Mettenleiter. 2007. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. Vet. Res. **38:**261-279.

Lüschow, D., O. Werner, T.C. Mettenleiter und W. Fuchs. 2001. Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. Vaccine **19:**4249-4259.

Müller, T., H.-J. Bätza, H. Schlüter, F.J. Conraths und T.C. Mettenleiter. 2003. Eradication of Aujeszky's disease in Germany. J. Vet. Med. B **50:**207-213.

Römer-Oberdörfer, A., E. Mundt, T. Mebatsion, U.J. Buchholz und T.C. Mettenleiter. 1999. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. J. Gen. Virol. **80:**2987-2995.

Smith, G.J.D., X.H. Fan, J. Wang, K.S. Li, K. Qin, J.X. Zhang, D. Vijaykrishna, C.L. Cheung, K. Huang, J.M. Rayner, J.S.M. Peiris, H. Chen, R.G. Webster und J. Guan. 2006. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. PNAS **103(45):**16936-41.

Starick, E., O. Werner, H. Schirrmeier, B. Köllner, R. Riebe und E. Mundt. 2006. Establishment of a Competitive ELISA (cELISA) System for the Detection of Influenza A Virus Nucleoprotein Antibodies and its Application to Field Sera from Different Species. J. Vet. Med. B **53:**370-75.

Swayne, D.E., J.R. Beck und N. Kinney. 2000. Failure of a Recombinant Fowl Poxvirus Vaccine Containing an Avian Influenza Hemagglutinin Gene to Provide Consistent Protection Against Influenza in Chickens Preimmunized with a Fowl Pox Vaccine. Avian Dis. **44:**132-137.

Taylor, J., Y. Weinberg, R.G. Kawaoka, G. Webster und E. Paoletti. 1988. Protective immunity against avian influenza induced by a fowl-pox virus recombinant. Vaccine **6:**504-508.

van Oirschot, J.T. 1999. DIVA vaccines that reduce virus transmission. J. Biotechnol. **73:**195-205.

Veits, J., O. Werner, D. Lüschow, W. Fuchs und T.C. Mettenleiter. 2003. Deletion of the nonessential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus hemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague. J. Gen. Virol. **84:**3343-52.

Veits, J., D. Wiesner, W. Fuchs, B. Hoffmann, H. Granzow, E. Starick, E. Mundt, H. Schirrmeier, T. Mebatsion, T.C. Mettenleiter und A. Römer-Oberdörfer. 2006. Newcastle disease virus expressing h5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. PNAS **103:**8197-202.

Institut für Virusdiagnostik und Institut für Epidemiologie:

Untersuchungen des Friedrich-Loeffler-Instituts zu Ausbrüchen hochpathogener aviärer Influenza bei Wildvögeln, Säugetieren und einem Hausgeflügelbestand in Deutschland 2006

Beer, M., Conraths, F.J., Globig, A., Harder, T.*, Hoffmann, B., Mettenleiter, T.C., Starick, E., Staubach, C., Unger, F. und Werner, O.

Im Jahr 1997 wurde bei Gänsen im Süden Chinas erstmalig ein hochpathogenes Influenza A Virus des Subtyps H5N1 (HPAIV H5N1) nachgewiesen. Dieser Erreger der Klassischen Geflügelpest hat sich seitdem weit in Südostasien und auch darüber hinaus verbreitet. Dabei erfuhr dieses Virus immer wieder Veränderungen, darunter verschiedene Reassortierungen mit anderen Influenza A Virussubtypen. Konstant blieb lediglich die Kombination der HA und NA Subtypen: H5N1. Aber auch in diesen Gensegmenten erfolgten - der Natur dieser RNA-Viren gemäß - vielfältige Mutationen, die zu verschiedenen phylogenetisch, aber auch antigen unterscheidbaren und geografisch restringierten Linien geführt haben. Parallel hierzu wurden Veränderungen biologischer Eigenschaften registriert, wie die Pathogenität in Wassergeflügel, Änderungen des Zell- und Gewebetropismus sowie das Vermögen, über Speziesgrenzen hinweg sogar auf Säuger, den Menschen eingeschlossen, übertragen werden zu können. Dieses zooanthroponotische Potential ist auch die Ursache des überproportionalen Interesses der Medien an diesem Virus, wobei die Sorge im Vordergrund steht, dass HPAIV H5N1 Ausgangspunkt einer neuerlichen Influenzapandemie bei Menschen werden könnte.

Nachdem sich H5N1 zumindest seit 2002 vor allem in Hauswassergeflügelpopulationen Südostasiens endemisch festgesetzt hatte, kam es im Frühjahr 2005 zu einem bis dato in der Geschichte der Geflügelpest unbekannten, heftigen Ausbruch der Seuche in wildlebenden Wasservögeln. Am nordchinesischen Qinghai-See waren mehrere Tausend Streifengänse sowie weitere Enten-, und Möwenarten von einem verlustreichen Seuchenzug des H5N1 Virus betroffen. War es zuvor bereits verschiedentlich zu vereinzelten und lokalen Nachweisen von H5N1 in Wildvögeln, jedoch stets in Verbindung mit Ausbrüchen bei Hausgeflügel, gekommen, so stellte dieser massive Einbruch des Virus in die Wildvogelpopulation ein Novum dar. Befürchtungen wurden laut, das Virus könne sich so ein weiteres „Standbein" der Perpetuierung in empfänglichen Wildpopulationen schaffen. Da einige der am Qinghai-See betroffenen Vogelarten als Zugvögel große Distanzen überwinden, wurden Szenarien der Verbreitung von H5N1 entlang der Vogelzugrouten erwogen.

Folgeausbrüche geringeren Umfangs bei Wildvögeln in der Mongolei, in Kasachstan und im Süden Russlands im Sommer 2005 schienen diese Befürchtungen zu bestätigen, obwohl nicht ausgeschlossen werden konnte - und kann -, dass (illegaler) Handel mit infiziertem Hausgeflügel bzw. Geflügelprodukten bei der innerasiatischen Ausbreitung eine Rolle gespielt hat. Mit dem weiteren Vordringen des Virus in die Schwarzmeer-Region, die Türkei und auf den Balkan gegen Ende 2005 wurden schließlich auch mitteleuropäische Gebiete durch das Virus akut bedroht. Dies führte zu verstärkten Monitoringuntersuchungen im Wildvogelbereich und zu einem weitgehenden Verbot der Freilandhaltung von Geflügel in Deutschland ab Oktober 2005.

In den ersten beiden Wochen des Februars 2006 wurden dann tatsächlich die ersten H5N1 Infektionen bei Wildvögeln in Mitgliedsstaaten der EU festgestellt. Fast zeitgleich wurden verendete, H5N1 positive Höckerschwäne östlich einer Linie, die von Südschweden über Rügen, die Donau bei Wien bis in die Adria, nach Sizilien und hinab ins griechische Evro-Delta reichte, gefunden. Das asiatische Geflügelpestvirus hatte die Europäische Union erreicht.

Verlauf der Infektionen mit hochpathogenem AIV vom Subtyp H5N1 bei Wildvögeln in Deutschland und der EU

Das Institut für Epidemiologie des Friedrich-Loeffler-Institutes wertete bereits seit 2005 kontinuierlich die verfügbaren Informationsquellen zu H5N1-Infektionen bei Wild- und Hausgeflügel aus, verfolgte das aktuelle Geschehen und machte es in den `Epidemiologischen Bulletins´ der Öffentlichkeit in aufbereiteter Form zugänglich. Belastbare Daten wurden in eine Risikobewertung umgesetzt, die zur Einschätzung der Einschleppungsgefahr durch H5N1 Virus bereitgestellt wurde.

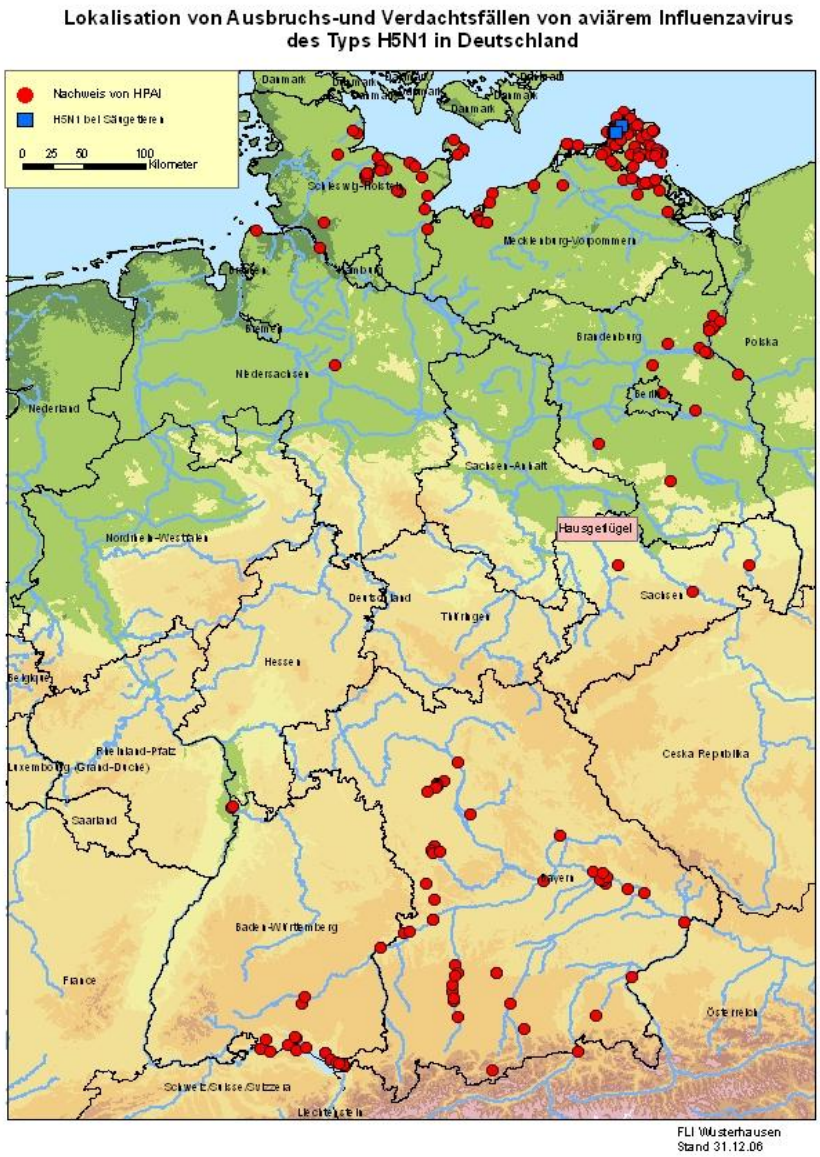


Abb. 1: Lokalisation 2006 tot aufgefundener, H5N1 hp-positiver Wildvögel (rote Punkte) und Säugetiere (blaue Punkte) in Verbindung mit der Darstellung von Flussläufen.
Die Markierung `Hausgeflügel´ bezeichnet den am Standort Wermsdorf von einem HP H5N1 Ausbruch betroffenen gemischten Hausgeflügelbestand.

In Deutschland wurden H5N1-Infektionen zuerst von der Insel Rügen gemeldet, die sich als ein Fokus der Infektion bei Wildvögeln erwies. Hier war es infolge der schon seit Dezember 2005 weitgehend zugefrorenen Boddengewässer zu einer hohen Dichte überwinternder Zug- und Standvögel in wenigen, durch die Gezeitenströmungen eisfrei gehaltenen Boddenbereichen (z.B. Wittower Fähre) gekommen. In diesen Gebieten, wo sich diverse Wasservogelspezies auf engstem Raum befanden, waren vor allem Sing- und Höckerschwäne sowie verschiedene Gänsearten von HPAIV H5N1-Infektionen betroffen. In den folgenden Wochen wurden weitere Fälle entlang der deutschen Ostseeküste und schließlich auch an der Nordsee sowie in Brandenburg, vor allem in der Nähe der Oder, offenkundig. Das Spektrum betroffener Arten erweiterte sich um Tauchenten (Reiher- und Tafelenten) und betraf dann zunehmend auch aasfressende Vogelarten wie Mäusebussarde sowie vereinzelt Krähenvögel. Eine Zusammenfassung der in Deutschland betroffenen Wildvogelarten findet sich in Tabelle 1. Bereits kurz nach Bekanntwerden der ersten Rügener Fälle fand man auch in Süddeutschland H5N1-Infektionen bei Wildvögeln. Infektionsherde etablierten sich am Bodensee sowie in Franken, wobei aber keine ausgesprochen zentrifugale Verbreitung von einem einzelnen Fokus, wie auf Rügen, offenbar wurde. Das Artenspektrum entsprach dem der Ausbrüche im Norden Deutschlands. Bis zum vorerst letzten Nachweis von H5N1 bei Wildvögeln im August 2006, wurden bundesweit insgesamt 344 Fälle registriert (Tabelle 1). Hinzu kommen vier Fälle bei Säugetieren (drei streunende Katzen sowie ein Steinmarder). Europaweit waren 753 Wildvögel betroffen, wobei die meisten Fälle in Deutschland, gefolgt von Österreich, nachgewiesen wurden. Seit Mai 2006 schien das H5N1-Geschehen trotz eines in den Bundesländern und am Nationalen Referenzlabor für Aviäre Influenza massiv ausgeweiteten Monitorings bei Wildvögeln zu sistieren, wobei

Mutmaßungen über den Verbleib des Virus von „verschwunden“ bis „weiterhin unerkannt vorhanden“ schwankten. Die aus dem Juli (Haubentaucher, Nordspanien) und August (Schwarzhalsschwan, Zoo Dresden) stammenden Einzelfunde von H5N1 bei wild- bzw. freilebenden Wasservögeln wiesen allerdings auf eine fortgesetzte Anwesenheit von HPAIV H5N1 in Wildvogelpopulationen hin. Trotz fehlender Nachweise von H5N1 in Wildvögeln in Europa seit August 2006 und dem völligen Fehlen von Nachweisen in lebenden Wildvögeln darf jedoch nicht von einem vollständigen Erlöschen der Infektion in den Wildvogelpopulationen ausgegangen werden.
Um eine bundesweit einheitliche Auswertung der infolge der Ausweitung der Monitoringuntersuchungen enorm angestiegenen Zahl beprobter Wildvögel zu ermöglichen, wurde auf einer vom FLI initiierten gemeinsamen Sitzung der Länder und des Bundes bei Beteiligung von Ornithologen beschlossen, eine nationale Datenbank zum Wildvogelmonitoring einzurichten. Seit November 2006 steht die Datenbank im Internet für den Probebetrieb zum Erfassen von Daten und seit dem 1. Dezember 2006 auch für den Routinebetrieb zuzüglich Datenauswertung zur Verfügung. In der Datenbank wird jeder tot aufgefundene, erlegte oder lebend beprobte Wildvogel mit seinen spezifischen Kennzeichen (z.B. Spezies, Geschlecht, Alter, Lokalisation) sowie den virologischen und/oder serologischen Laborergebnissen erfasst. Die Dateneingabe erfolgt dezentral in den Untersuchungsreinrichtungen und Veterinärämtern der Länder über eine HTML-Maske im Browser oder durch Upload einer Übergabedatei aus den Labormanagementsystemen. Da nicht nur positive Befunde berücksichtigt werden, ergeben sich neue umfangreiche Analysemöglichkeiten (z.B. Stichprobenbeurteilung in Zeit und Raum, Prävalenzschätzungen). Neben den zentral bereitgestellten Auswertungsmöglichkeiten in Form von Tabellen, Diagrammen und Karten wird durch die automatische Generierung von spezifischen Reporten die Berichterstattung an die Europäische Union erheblich vereinfacht.

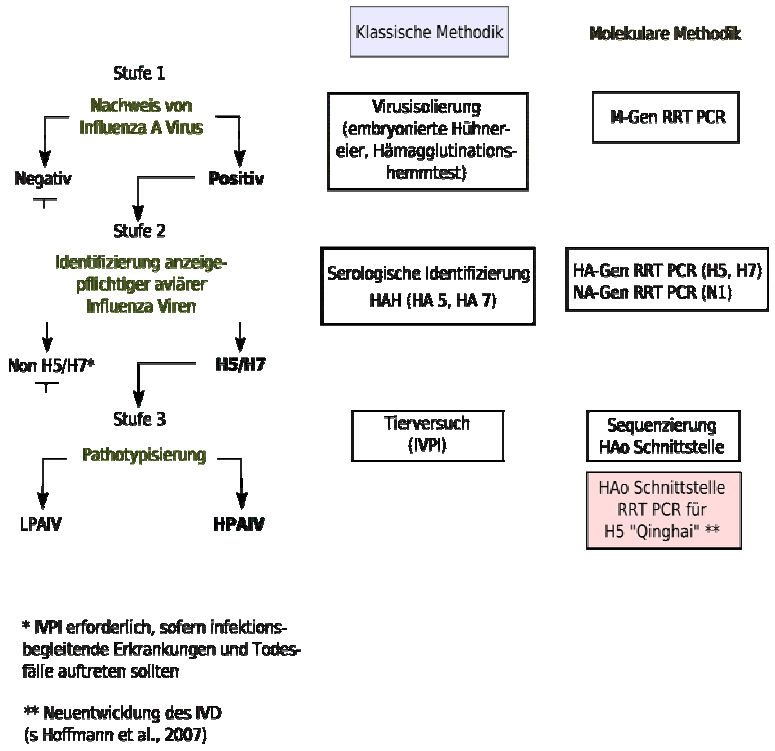


Abb. 2: Kaskade der diagnostischen Untersuchungen auf Geflügelpest.

Die Intensivierung des Wildvogelmonitorings war nur infolge einer Anpassung der diagnostischen Methoden möglich (Abb. 2). In enger Abstimmung mit dem EU-Referenzlabor wurden am FLI moderne Methoden des Virusnachweises mittels RT *real-time* PCR (rRT-PCR) etabliert und hinsichtlich der Charakterisierung detektierter Viren weiterentwickelt. Validierte Verfahren wurden durch mehrere Fortbildungsveranstaltungen an die Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer weitergegeben.

Tabelle 1. H5N1 positive Wildvögel und Säuger in Deutschland

Wissenschaftl. Name	*Deutscher Name*	**Positive**
Order: Ciconiiformes	Störche, Reiher	
Ardea cinerea	Graureiher	1
Ardea spec.	Reiher	1
Ciconia ciconia	Weißstorch	2
Order: Podicipediformes	Lappentaucher	
Podiceps cristatus	Haubentaucher	4
Order: Anseriformes	Entenvögel	
Anas spec.	Ente	21
Anas platyrhynchos	Stockente	4
Aythya fuligula	Reiherente	18
Aythya marila	Bergente	1
Aythya ferina	Tafelente	8
Bucephala clangula	Schellente	1
Melanitta fusca	Samtente	1
Melanitta nigra	Trauerente	1
Mergus serrator	Mittelsäger	1
Mergus merganser	Gänsesäger	5
Anas streptera	Schnatterente	1
Anser spec.	Gans	4
Anser anser	Graugans	7
Branta canadensis	Kanadagans	21
Anser fabalis	Saatgans	1
Branta leucopsis	Weißwangengans	2
Cygnus spec.	Schwan	22
Cygnus olor	Höckerschwan	130
Cygnus cygnus	Singschwan	32
Cygnus atratus (zoo)	Trauerschwan	1
Order: Charadriiformes	Möwen-,Watvögel	
Larus spec.	Möwe	4
Larus marinus	Mantelmöwe	2
Larus argentatus	Silbermöwe	3
Larus canus	Sturmmöwe	1
Order: Accipitriformes	Greifvögel	
Buteo spec.	Bussard	8
Buteo buteo	Mäusebussard	20
Circus cyaneus	Kornweihe	1
Accipiter gentilis	Habicht	1
Falco spec.	Falke	1
Falco peregrinus	Wanderfalke	2
Falco tinnunculus	Turmfalke	1
Order: Strigiformes	Eulen	
Bubo bubo	Uhu	2
Order: Gruiformes	Kranichvögel	
Fulica atra	Blesshuhn	2
Order: Phalacrocoraciformes	Kormoranvögel	
Phalacrocorax carbo	Kormoran	3
Order: Passeriformes	Sperlingsvögel	
Corvus corone cornix	Nebelkrähe	1
Garrulus glandarius	Eichelhäher	1
Aves	unbekannt	1
Mammalia	Säugetier	4

Insbesondere ist auf ein neues Verfahren zur Pathotypisierung mittels rRT-PCR hinzuweisen, das erstmals erlaubt, hochpathogene Varianten des H5N1 Stammes „Qinghai“ und dessen Derivate binnen weniger Stunden zu detektieren (Hoffmann et al., 2007). Niedrigpathogene H5-Stämme sowie H7-Stämme werden von dieser PCR nicht erfasst. Im Verlauf der Ausbrüche von HPAIV H5N1 Infektionen bei Wildvögeln in Deutschland hat sich dieses Diagnostikverfahren als sehr vorteilhaft erwiesen; oftmals wurde das Virus in den bereits teilweise in Verwesung übergegangenen Kadavern nur noch in sehr geringen Mengen nachgewiesen, die eine Virusanzucht bzw. molekulare Charakterisierung mittels Sequenzierung nicht mehr zuließen. Lediglich die rRT-PCR erwies sich in diesen Fällen als sensitiv genug für eine direkte Pathotypisierung.

Pathologie der H5N1 hp Infektionen bei Wildvögeln und Säugetieren in Deutschland

Pathologisch-anatomische und –immunhistochemische Untersuchungen verschiedener Arten der tot aufgefundenen Wildvögel zeigten, dass von einer stark speziesspezifisch gefärbten Ausprägung klinischer und pathologischer Veränderungen auszugehen ist. Schwäne und Wildgänse wiesen dabei häufig Zeichen eines endotheliotropen Verlaufes der H5N1 HP Infektion auf, wobei auch perakute Todesfälle gut genährter Vögel auftraten. Ein starker Neurotropismus des H5N1-Virus wurde bereits in Schwänen und Gänsen auch klinisch offenbar. Im Zuge eines eher protrahiert verlaufenden Infektionsgeschehens zeigten die Tiere Desorientiertheit, schwere Gleichgewichtsstörungen sowie Zwangsbewegungen. Diesen Veränderungen lag eine schwere virusinduzierte Enzephalitis zugrunde. Die neurotrope Form der Erkrankung konnte zudem besonders bei Greifvögeln (Bussarde, Eulen) nachgewiesen werden, die sich offenbar an Kadavern gefallener Wasservögel infiziert hatten.

Drei streunende Katzen auf der Insel Rügen verendeten aufgrund natürlich erworbener HPAIV H5N1-Infektionen. Ein oraler Infektionsweg wurde durch die vorherrschenden schweren Leberveränderungen der Katzen suggeriert. Daneben wurde ein Steinmarder auf Rügen mit einer H5N1-Infektion angetroffen, die sich bei diesem Tier als eine virusinduzierte Enzephalitis manifestierte. Ein 2006 fortgesetztes, engmaschiges virologisches und serologisches Monitoring von Hauskatzen bzw. Wildkarnivoren der Insel Rügen ergab lediglich bei zwei weiteren, klinisch unauffälligen Hauskatzen einen Hinweis auf Kontakte mit HPAIV H5N1.

Epidemiologie und phylogenetische Analyse der H5N1 HP Infektionen bei Wildvögeln und Säugetieren in Deutschland

In den eisfreien Zonen der Rügener Küstengewässer waren neben Schwänen und Gänsen auch Gründel- und Tauchenten vertreten. Nach Schwänen und Gänsen waren Tauchenten, vor allem Reiher- und Tafelenten, die am häufigsten von HPAIV H5N1 betroffenen Wasservogelarten. Gründelenten dagegen waren mit auffallend geringen Zahlen unter den infizierten Tieren vertreten, obwohl sie, vor allem wegen der hohen Dichte von Stockenten, die Mehrzahl der *Anatidae* ausmachen. Bundesweit konnten nur zwei H5N1-positive verendete Stockenten detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Gründelenten möglicherweise weniger empfänglich gegenüber HPAIV-H5N1-Infektionen sind. Diese Vermutung konnte mittlerweile durch experimentelle Infektionen von Krick-, Schnatter-, Stock- und Spießenten bestätigt werden: Obwohl diese Arten prinzipiell empfänglich sind, machen sie bestenfalls mild verlaufende, epitheliotrope H5N1 HP-Infektionen durch, die jedoch zu einer Virusausscheidung, vor allem über den Oropharynx führen (Brown et al., 2006; Fouchier, 2006, pers. Mitteilung). Es ist daher anzunehmen, dass mindestens die letztgenannten Arten auch im Rahmen natürlicher Infektionen mit H5N1 keine gravierenden Erkrankungen entwickeln und vermutlich sogar mobil und damit migrationsfähig bleiben. Somit könnte diesen Arten eine epidemiologisch bedeutsame Rolle in der Verbreitung von HPAIV H5N1 auch über größere Entfernungen hinweg zukommen. Allerdings konnten bis dato innerhalb der EU keine lebenden Vögel mit einer aktiven HPAIV-H5N1-Infektion nachgewiesen werden.

Molekular-epidemiologische Untersuchungen an 23 HPAIV-H5N1-Isolaten aus Wildvögeln, die in Deutschland gefunden wurden, zeigten, dass zwei geographisch restringierte Cluster (Nord- und Südcluster) der sogenannten Qinghai-Linie dieses Virus in Deutschland unterschieden werden können. Die nächsten genetischen Verwandten dieser Cluster rekrutieren sich aus H5N1-Stämmen, die 2005 in Zentralrussland nachgewiesen wurden (Nordcluster) bzw. aus der Schwarzmeerregion stammen (Südcluster). Diese geografische Trennung der Cluster ist jedoch nicht vollkommen; einige Isolate aus dem Süden Deutschlands sind phylogenetisch dem Nordcluster zuzuordnen und umgekehrt. Insgesamt aber lassen diese Daten den Schluss zu, dass im Januar oder Februar 2006 mindestens zwei separate Einträge des HPAIV H5N1 nach Deutschland erfolgt sind. Aufgrund einer Kältewelle in Zentralasien im Januar

2006 und dem nahezu zeitgleichen Auftreten von H5N1 HP-Infektionen bei Wildvögeln im östlichen Teil Europas Anfang Februar bis zu einer Linie, die von Südschweden bis Sizilien reichte, kann angenommen werden, dass winterflüchtende Wildvögel das Virus aus dem Osten mitgebracht hatten.
Die auf der Insel Rügen nachgewiesenen Infektionen von Säugetieren sind höchst wahrscheinlich durch Fressen an Kadavern infizierter Wildvögel zustande gekommen. Dies legt der anhand patho-histologischer Untersuchungen vermutete orale Infektionsweg sowie eine sehr enge genetische Verwandtschaft der felinen Virusiolate mit denen von Rügener Wildvögeln nahe (Weber et al., 2007).

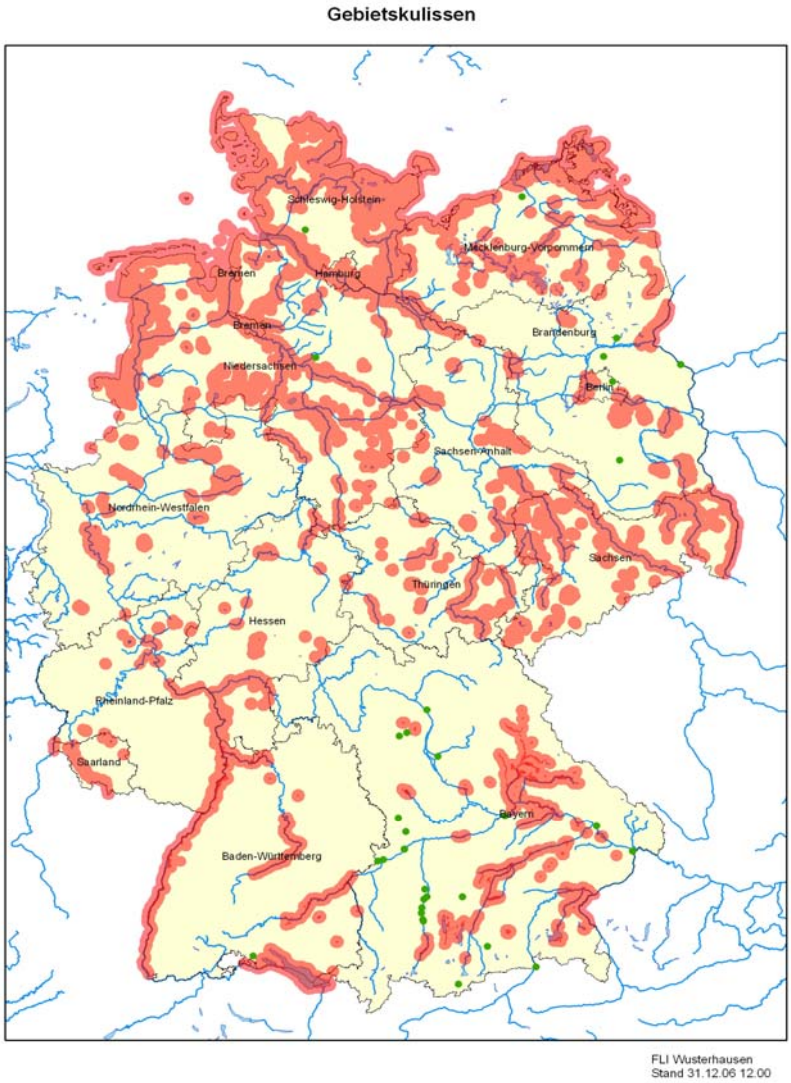


Abb. 3: Risikogebiete (rot gefärbte Bereiche), in denen Freilandhaltung von Geflügel verboten ist. Grüne Punkte kennzeichnen Fundorte HPAIV-H5N1-positiver Wildvögel, die außerhalb der von den Bundesländern ausgewiesenen Risikogebieten liegen. Die tatsächlich festgelegten Risikogebiete wurden in dieser Darstellung mit einem Puffer von 5 km umgeben, um falsche Interpretationen zu Gebieten zu vermeiden, die sich durch Ungenauigkeiten bei der Digitalisierung ergeben können.

Auswirkungen auf die Wirtschaftsgeflügelhaltung

Nachdem 2005 zunächst ein bundesweit gültiges Aufstallungsgebot erlassen worden war und damit die Freilandhaltung von Wirtschaftsgeflügel vollständig untersagt war, traten im Laufe des Jahres 2006 Lockerungen dieses Gebotes in Kraft, die eine weitgehende Wiederzulassung der Freilandhaltung ermöglichen. Die Bundesländer wiesen hierzu Risikogebiete aus, in denen die Freilandhaltung weiterhin verboten bleibt (Abbildung 3). Die Ausweisung dieser Gebiete richtete sich nach den potentiellen Kontakten zwischen migrierenden, aquatisch lebenden Wildvögeln und im Freiland gehaltenem Hausgeflügel, der Nähe von Geflügelhaltungen zu Gewässern und der Dichte der Hausgeflügelpopulation in einer Region. In der Mehrzahl der Fälle decken sich diese Risikogebiete mit den Fundorten H5N1-infizierter Wildvögel. Inkongruente Lokalisationen sind in der Karte mit einem grünen Punkt markiert (Abbildung 3). Sie betreffen teilweise infizierte Beutegreifer (z. B. in Brandenburg).

Trotz der Flexibilisierung des Aufstallungsgebots bleiben einige Geflügelwirtschaftszweige in erheblichem Umfang von den Maßnahmen betroffen. Hierzu zählen an erster Stelle Gänsezuchtbetriebe, die ohne ausreichenden Freilandauslauf ihrer Tiere nicht rentabel arbeiten können.

Forschungstätigkeiten zur aviären Influenza am Friedrich-Loeffler Institut

Infolge der erheblichen Bedrohung der Geflügelbestände durch das HPAIV H5N1 asiatischer Herkunft hat die Bundesregierung 2006 ein Sofortprogramm für die Influenzaforschung aufgelegt (FSI). In dieses Programm sind mit einzelnen Projekten das Robert-Koch Institut, das Paul-Ehrlich Institut und das Friedrich-Loeffler-Institut einbezogen.

Im FLI sind 2006 bereits einige Projekte mit vornehmlich epidemiologischem Bezug bzw. mit einem auf die Anwendung verfügbarer Impfstoffe und die Entwicklung neuer Vakzinen ausgerichteten Schwerpunkt gestartet. Zu ersteren gehören systematische Untersuchungen von Wildvögeln und Wildsäugern im Kerngebiet des H5N1-Ausbruchs auf der Insel Rügen, die bislang jedoch keinerlei über April 2006 hinausgehende Virusaktivität nachweisen konnten. Weiterhin wurden an drei Standorten in Deutschland Sentinelentenbestände aufgebaut. Mittels dieser `Wächtertiere´, die mittelbaren, gelegentlich auch direkten Kontakt mit einer Vielzahl wildlebender Wasservögel haben, sollen Prävalenzen aviärer Influenzavirus-infektionen, auch über die Detektion von HPAIV H5N1 hinausgehend, ermittelt werden.

Sollte sich ein konstanter Infektionsdruck ausgehend von H5N1 HP-infizierten Wildvögeln in Deutschland aufbauen, müsste zumindest eine Impfung der Freilandgeflügelbestände in Erwägung gezogen werden. Statistisch gesicherte Daten über einen sinnvollen und nutzbringenden Einsatz der derzeit kommerziell verfügbaren Impfstoffe existieren jedoch nicht. Abhilfe soll hier eine Feldstudie des FLI schaffen, in der ausgewählte Geflügelbestände unter Feldbedingungen gegen H5 vakziniert werden. Die Populationsimmunität dieser Herden wird über längere Zeiträume verfolgt und die Protektivität der so aufgebauten Immunität wird durch Belastungsversuche einzelner Tiere aus diesen Beständen im FLI regelmäßig geprüft. Darüber hinaus befassen sich weitere Projekte im Rahmen des FSI mit der Entwicklung und Erprobung neuartiger Impfstoffe gegen HPAIV (siehe S. 25-32) sowie mit flankierenden Diagnostika, die eine Umsetzung des DIVA-Prinzips (*differentiate infected from vaccinated animals*) auch auf dem Gebiet der AI erlauben würden.

Daneben sind verschiedene Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der aviären Influenza in nationale und internationale Forschungsnetzwerke eingebunden, die sich unter anderem aus EU-Mitteln (FP6) finanzieren.

Literatur

Weber, S., T. Harder, E. Starick, M. Beer, O. Werner, B. Hoffmann, T.C. Mettenleiter und E. Mundt. 2007. Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany. J. Gen. Virol. **88:**554-558.

Hoffmann, B., T. Harder, E. Starick, K. Depner, O. Werner und M. Beer. 2007. Rapid and Highly Sensitive Pathotyping of Avian Influenza A H5N1 Virus by Using Real-Time Reverse Transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. **45:**600-603.

Institut für Infektionsmedizin:

Bachforellensterben in voralpinen Flüssen Bayerns – infektions- und immunbiologische Untersuchungen zur Ursache der Krankheit

Winkler, C., Köllner, B.*, Fichtner, D., Polster, U. und Granzow, H.

Seit über zehn Jahren wird in Bayern, Österreich und der Schweiz im Spätsommer ein „Bachforellensterben" in freien Fließgewässern beobachtet. Die klinischen Symptome sind prägnant: Schwarzfärbung, Apathie, Abmagerung, Schnappatmung, schließlich Tod innerhalb weniger Stunden. In einem relativ engen Zeitfenster von vier Wochen (August/September) verenden 70 - 100 % der gesamten Population eines Gewässersystems. Die Bachforelle als Leitfischart der Forellenregion ist dadurch in zahlreichen Gewässern zur aussterbenden Art geworden.
Histopathologisch zeigen sich Blutungen in inneren Organen (Leber, Niere, Milz, Magen-Darmtrakt), Zellnekrosen und Entzündungsherde in Niere und Leber sowie lymphozytäre Depletionen in der Milz. Das Finalstadium ist von einer starken Anämie und Leukopenie geprägt (Schwaiger J., Ferling H., 2003. Pathologie und Immunstatus betroffener Bachforellenpopulationen. Symposiumsband „Bachforellensterben in Bayern", Hrsg. Landesfischereiverband Bayern e.V.).
Bisherige Untersuchungen im Bayerischen Landesamt für Umwelt belegen, dass Faktoren im Gewässer selbst (z.B. chemische, chemisch-physikalische oder biologische Faktoren) eine entscheidende Rolle bei der Erkrankung spielen. In Expositionsversuchen zwischen 2000 und 2004 in einer Durchflussanlage an der Iller wurden Ursache und Verlauf der Erkrankung untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Haltung im Illerwasser ab Anfang Mai eine 100%ige Mortalität der eingesetzten Bachforellen induzierte. Gleichzeitig konnte die in Freiland beobachtete strenge Speziesspezifität der Erkrankung – Regenbogenforellen oder Äschen sind nicht betroffen – bestätigt werden.
Die Untersuchungen im Fischgesundheitsdienst in Bayern ergaben jedoch keine Hinweise auf Infektionserreger als Krankheitsursache. Chemische Analysen des Flusswassers sowie eine Rückstandsanalytik moribunder Forellen zeigten keine Grenzwertüberschreitungen potenziell toxischer Subtanzen.
Mit einer Behandlung des Flusswassers durch eine Filterung über Quarzsand/Aktivkohlefilter bzw. UV-Bestrahlung sollten indirekte Hinweise auf die Ursache gewonnen werden. Die Filterung über Quarzsand/Aktivkohlefilter bewirkte lediglich eine Verschiebung des Mortalitätsgeschehens um etwa vier Wochen. Dies und die negativen Ergebnisse der chemischen Analytik der Filtermedien sprechen gegen eine direkte toxische Ursache für das Bachforellensterben. Die UV-Bestrahlung konnte dagegen das Bachforellensterben komplett verhindern. Dieses Ergebnis sowie die strenge Speziesspezifität weisen eher auf eine infektiös bedingte Erkrankung durch einen bisher nicht nachgewiesenen Erreger hin. Allerdings könnte auch die Kombination aus Immunsuppression durch chemische Noxen (möglicherweise UV-sensitiv) mit nachfolgender Infektion durch einen fakultativ pathogenen Erreger (durch UV inaktiviert) die Erkrankung auslösen.
Durch die nachfolgend dargestellten infektions- und immunbiologischen Untersuchungen im Institut für Infektionsmedizin des FLI Insel Riems in den Jahren 2005 und 2006 sollte vor allem die mögliche infektiöse Ursache der Erkrankung gefunden werden.

Untersuchungen 2005

Untersuchungen in Organen moribunder Bachforellen

Im Jahr 2005 wurden Organproben moribunder, im Illerwasser gehaltener Bachforellen mit Organproben gesunder, im Quellwasser gehaltener Bachforellen aus dem Expositionsversuch 2004 vergleichend untersucht. In den untersuchten Proben moribunder Bachforellen konnten weder virale noch bakterielle Krankheitserreger nachgewiesen werden. Die in Europa verbreitet vorkommenden „klassischen" Salmoniden-spezifischen Viren bzw. Bakterien scheiden als Ursache des Bachforellensterbens aus (Tab. 1).

Tabelle 1: Infektionsbiologische Untersuchungen von Organproben moribunder Bachforellen

Untersuchung	Ergebnis
Ko-Kultur von Organanreibungen auf acht verschiedenen empfänglichen Zelllinien	negativ
elektronenmikroskopische Untersuchung von Organanreibungen im Negativkontrast	negativ
Nachweis viraler RNA/DNA aus allen Organanreibungen mittels RT-PCR (VHSV, IHNV, IPNV, ISAV, Sleeping disease Virus, EHNV)	negativ
Kultur aus Organanreibungen auf Selektivnährböden	negativ
Untersuchung von histologischen Schnitten (Gram-Färbung)	negativ
Nachweis bakterieller DNA aus allen Organanreibungen (A. salmonicida, A. hydrophila, Vibrio sp, R. salmoninarum)	negativ

In histologischen und immunhistologischen Untersuchungen wurden die in Voruntersuchungen nachgewiesenen pathologischen Veränderungen in den Organen moribunder Bachforellen bestätigt. Es zeigten sich eine massive entzündliche, teils mit Nekrose einhergehende Schädigung der Nieren, ein nahezu vollständiger Glykogenverlust in der Leber gepaart mit einer Degeneration von Hepatozyten und eine starke Lymphozytendepletion, vor allem von B-Zellen in der Milz.

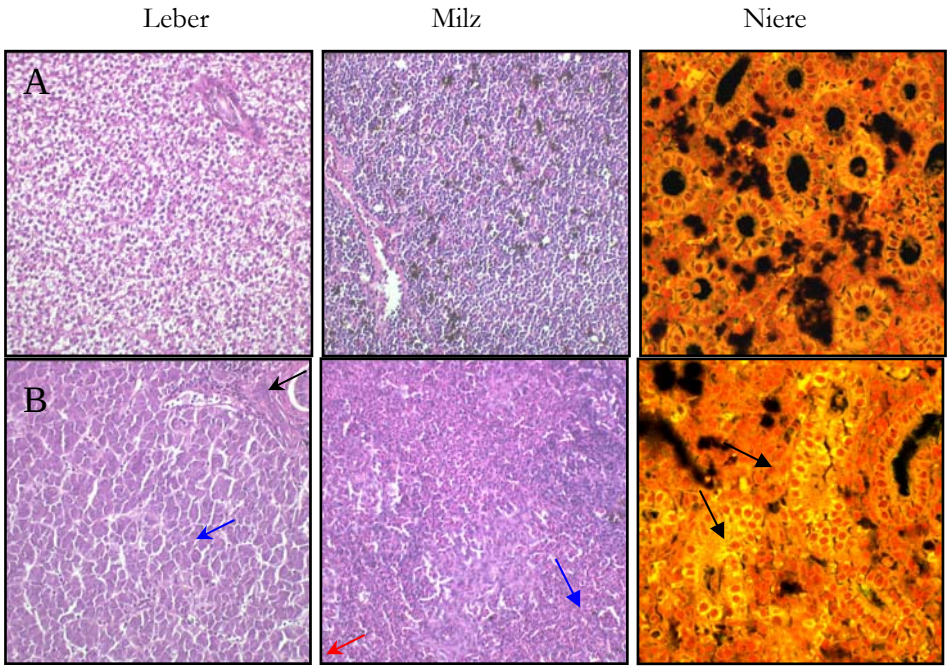
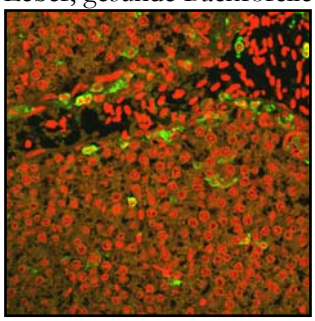


Abb. 1: Vergleichende Histologie von Leber, Milz und Niere aus Bachforellen
(A) gesunder Kontrollfisch **(B)** moribunde Bachforellen
Leber: Verlust vom gespeichertem Glykogen; perivaskuläre Leukozyteninfiltration (↓); Bildung von mehrkernigen Zellen (↓); Degeneration von Hepatozyten (↓)
Milz: Aggregation und Degeneration der Melanomakrophagen (↓); ausgeprägte Depletion von Lymphozyten (↓)
Niere: Aggregationen im Zytoplasma der Tubulusepithelzellen bei Verlust der Tubulusstruktur

Darüber hinaus war in Leber und Niere ein hoher Prozentsatz von MHC II positiven Entzündungszellen nachweisbar. In der Milz ist der massive Verlust von B-Lymphozyten hervorzuheben.

Leber, gesunde Bachforelle



Leber, moribunde Bachforelle

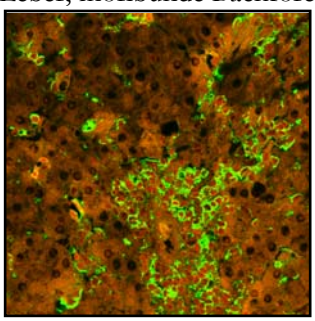
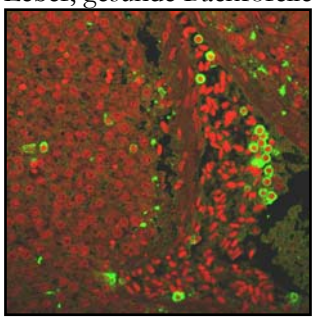


Abb. 2: Expression von MHC II.
Auffällig ist der massive Einstrom MHC II positiver Zellen in Bereichen mit degenerierten Hepatozyten bei den moribunden Bachforellen.

Leber, gesunde Bachforelle



Leber, moribunde Bachforelle

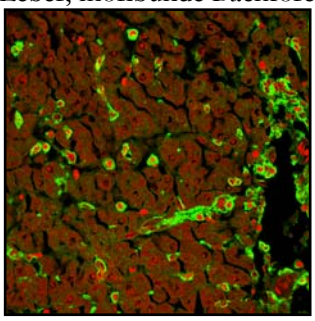
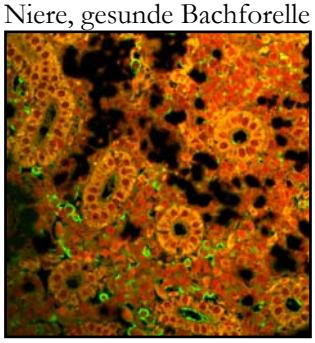


Abb. 3: Verteilung von Granulozyten im Lebergewebe.
Beachte die massive Infiltration von Granulozyten im degenerierten Lebergewebe moribunder Bachforellen.

Niere, gesunde Bachforelle



Niere, moribunde Bachforelle

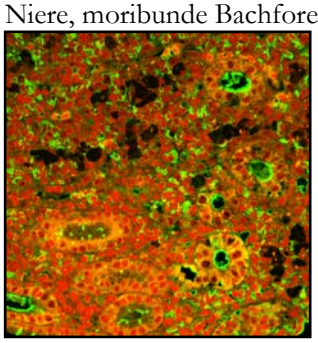
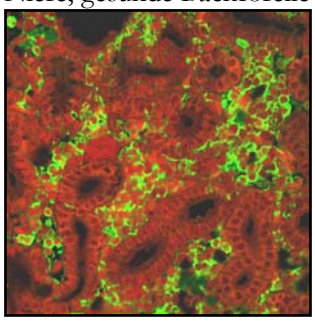


Abb. 4: Expression von MHC II.
Auffällig ist der massive Einstrom MHC II positiver Zellen im interstitiellen Gewebe bei den moribunden Bachforellen.

Niere, gesunde Bachforelle



Niere, moribunde Bachforelle

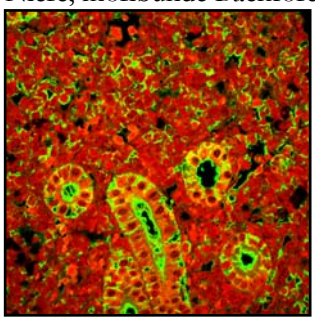
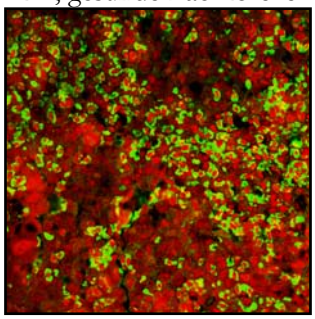


Abb. 5: Expression von MHC II.
Auffällig ist der massive Einstrom von Granulozyten im interstitiellen Gewebe bei den moribunden Bachforellen.

Milz, gesunde Bachforelle



Milz, moribunde Bachforelle

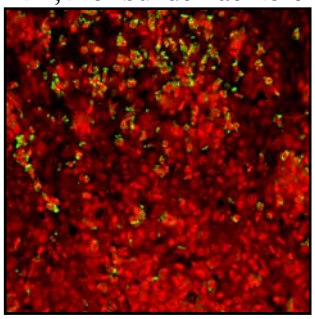


Abb. 6: Expression von sIgM.
Auffällig ist die massive Depletion von sIgM+ B-Lymphozyten bei den moribunden Bachforellen.

Jede der gefundenen histopathologischen Veränderungen hätte allein den Tod der Tiere verursachen können.

Tabelle 2: Mögliche Ursachen, die, ausgehend von den gefundenen histopathologischen Veränderungen in Organen moribunder Forellen, zum Tode der erkrankten Bachforellen führen können

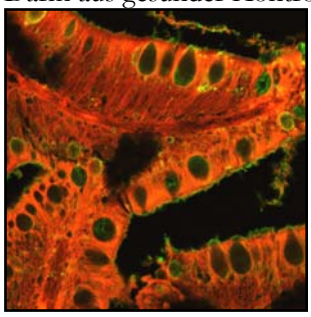
Organ	Schädigung	Tod durch
Leber	Glykogenverlust	Verhungern
	Hepatozytendegeneration	Stoffwechselstörung, Vergiftung
Nieren	Degenerationen	Exkretionsstörung
Milz	Lymphozytendepletion	Ausfall von Immunfunktionen

Die im Endstadium der Erkrankung beschriebene Anämie und Leukopenie ist sehr wahrscheinlich durch eine Verbrauchskoagulopathie in Folge massiver Schädigungen in der Leber und den Nieren verursacht. Der resultierende starke Verlust von Erythrozyten in der Blutzirkulation bewirkt einen massiven Sauerstoffmangel im Gesamtorganismus mit nachfolgendem Erstickungstod.

Ist die Erkrankung auf gesunde Bachforellen übertragbar?

Mit Organanreibungsmaterial von moribunden Bachforellen wurden gesunde Bachforellen oral und per Bad „infiziert". Diese einmalige Verabreichung führte nach ca. zwölf Wochen zu klinischen Symptomen, die den beim Bachforellensterben beobachteten gleichen. Die Forellen nahmen deutlich vermindert Futter auf und magerten ab. Die histopathologischen Veränderungen in Leber, Nieren und Milz gleichen den oben beschriebenen Befunden. Im Darm wurden zusätzlich eine Schädigung der Submukosa und eine bisher unbekannte partikuläre Aggregation in den Becherzellen nachgewiesen (Abb. 7).

Darm aus gesunder Kontrollforelle



Darm aus kranker Bachforelle

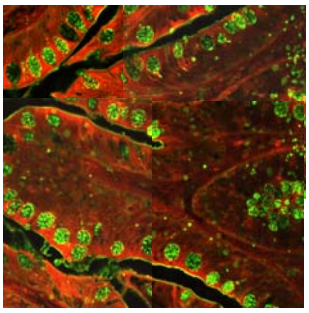


Abb. 7: Expression von MHC II.
Partikuläre Aggregation (MHC II + Strukturen) in den Becherzellen bei kranken Bachforellen.

Allerdings erholten sich die erkrankten Forellen ab etwa 15 Wochen nach der Verabreichung der Organanreibung moribunder Bachforellen. Zu keinem Zeitpunkt war Anämie oder Leukopenie nachweisbar. Es gelang auch nicht, aus den erkrankten Forellen einen viralen oder bakteriellen Erreger zu isolieren.

Ein Pathogenesemodell

Als Ursache für das Bachforellensterben muss ein bisher unbekannter, sich wahrscheinlich sehr langsam vermehrender Infektionserreger oder eine multifaktorielle Ursache, d.h. eine Störung des physiologischen Gleichgewichtes, z.B. durch toxische Substanzen, mit nachfolgender erhöhter Empfindlichkeit gegenüber schwach oder fakultativ pathogenen Erregern, angenommen werden. Ausgehend von den Befunden bei den moribunden Forellen aus dem Expositionsversuch und den Befunden bei den Forellen aus dem Übertragungsversuch ist folgende Kausalkette denkbar (Abb. 8):

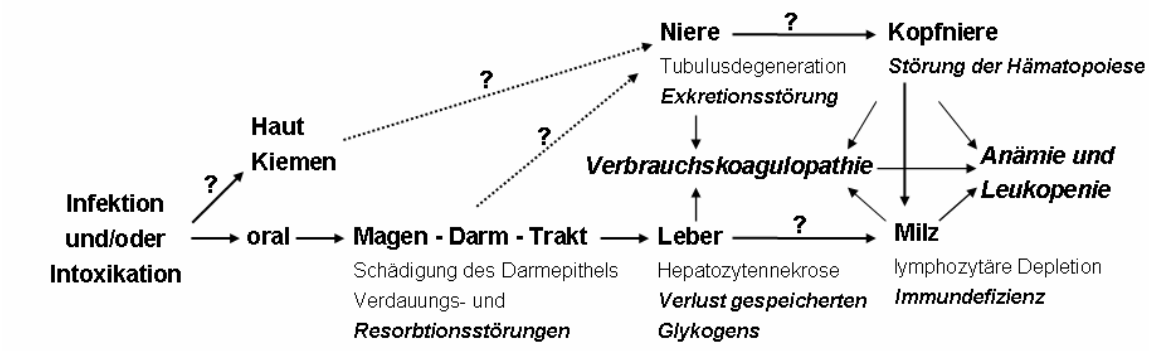


Abb. 8: Pathogenesemodell, ausgehend von den histopathologischen Befunden bei moribunden Forellen aus der Iller und bei erkrankten Forellen aus dem Übertragungsversuch. Kursiv hervorgehoben sind Störungen physiologischer Funktionen.

Untersuchungen 2006

Versuchsansatz

Ziel der Untersuchungen 2006 war es, eine der beiden angenommenen Ursachen (Infektion mit einem bisher unbekannten, fakultativ pathogenen oder sich sehr langsam vermehrenden Erreger bzw. eine multifaktorielle, möglicherweise durch toxische Substanzen ausgelöste Erkrankung) durch einen modifizierten Versuchsansatz nachzuweisen oder auszuschließen. Dazu wurden:

1. Im Expositionsversuch kontinuierlich Organproben 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn der Exposition, sowie mit Beginn des Sterbens genommen, um die Kinetik der Erkrankung zu untersuchen und gleichzeitig die Chance zu erhöhen, einen Krankheitserreger zu finden, der in moribunden Fischen nicht mehr nachweisbar ist. Dabei wurden Proben aus drei Expositionsgruppen entnommen und vergleichend untersucht:
   a) Iller-nativ-Gruppe: Bachforellen in ungefiltertem Illerwasser exponiert,
   b) Iller-UV-Gruppe: Bachforellen in UV-bestrahltem Illerwasser exponiert und
   c) Kontrollgruppe: Bachforellen in Quellwasser gehalten.
2. Im Infektionsversuch 2006 wurde Organmaterial aus den mehrmaligen Probennahmen des Expositionsversuches 2005 mehrfach auf gesunde Bachforellen oral oder über Bad übertragen, um einen möglichen Infektionsweg über die Kiemen und/oder den Verdauungstrakt zu untersuchen. Aus den Gruppen wurden Bachforellen zu gleichen Zeitpunkten wie in der Freilandexposition untersucht, um die Klinik zu vergleichen. Die Daten wurden mit denen aus dem Infektionsversuch 2005 verglichen.
3. Das Organmaterial der Bachforellen aus dem Expositions- und den Infektionsversuchen wurde vergleichend infektionsbiologisch, histopathologisch und immunologisch untersucht.

Kinetik der klinischen Symptome

Im **Expositionsversuch 2005** starben erste Bachforellen der Iller-nativ-Gruppe in der 17. Woche nach Besatz (10.05 – 08.09.) nach klinischen Symptomen (Apathie, Dunkelfärbung), die denen der vorangegangenen Jahre entsprachen. Addiert man die entnommenen, moribunden Forellen zu etwa gleichen Teilen zu den toten Forellen nach Entnahme, so ergibt sich ein Zeitraum von nur sieben Tagen (12.09. – 17.09.), in dem mehr als 60 % der Bachforellen starben (Abb. 9). In der Iller-UV Gruppe starben fünf Bachforellen über den gesamten Zeitraum von Mai bis September, in der Kontrollgruppe erkrankten keine Forellen.

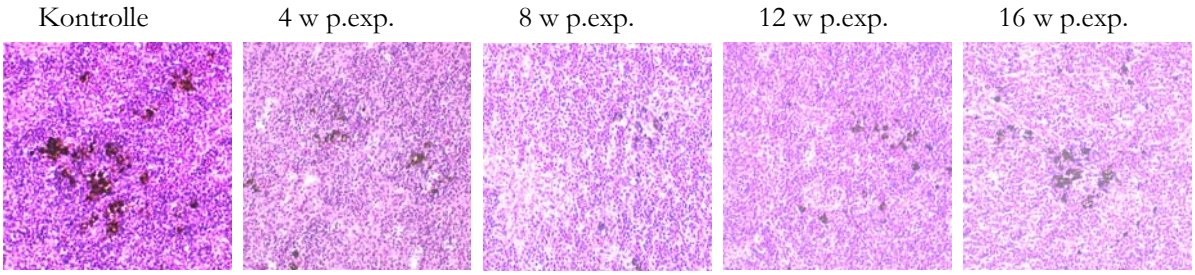


Abb. 9: Die Milz von Kontrollforellen enthält die rote Pulpa und zahlreiche Blutsinusoide, die das blutbildende Gewebe durchziehen.
In der weißen Pulpa sind zahlreiche lymphoide Zellen um die sogenannten Melanomakrophagenzentren diffus verteilt. In Milzen von Bachforellen der Iller-nativ-Gruppe ist eine zunehmende Lymphozytendepletion und Degeneration der Melanomakrophagenzentren ab der 4. Woche post exp. nachweisbar.

Im **Infektionsversuch 2006** wurde acht Wochen nach Beginn der Applikationen eine reduzierte Futteraufnahme in der Oral-Gruppe beobachtet. Zwölf Wochen post appl. waren einige Bachforellen dunkel gefärbt, stark abgemagert und apathisch. Diese Bachforellen wurden aus ethischen Gründen aus dem Versuch genommen und getötet. Sechzehn Wochen post appl. waren keine Krankheitszeichen bei den verbliebenen Bachforellen zu finden. Zwanzig Wochen post appl. zeigten diese weder klinische Anzeichen noch signifikanten Gewichtsunterschiede zu Bachforellen der Bad- und Kontrollgruppe.
Pathologische Veränderungen in den Organen (leere Därme; vergrößerte, brüchige Milzen) zeigten sich bei der Oral- und schwächer ausgeprägt bei der Bad-Gruppe 48 Stunden nach der zweiten Applikation. Achtundvierzig Stunden nach der vierten Applikation wurden bei Bachforellen der Oral-Gruppe deutlich vergrößerte Milzen und leere, teilweise blutig entzündete Därme gefunden. Diese Organveränderungen verstärkten sich und zwölf Wochen post appl. wurden, einhergehend mit den äußeren Krankheitssymptomen, schwere Organveränderungen diagnostiziert:

- der Magen/Darm-Trakt war, bis auf ein gelblich körniges Exudat, leer;
- der Fettspeicher zwischen den Pylorusschläuchen war z.T. vollständig aufgebraucht;
- der Enddarm war stark atrophiert und zeigte blutig-entzündliche Veränderungen;
- die Milz war brüchig und vergrößert;
- die Leber zeigte aufgehellte Areale und war brüchig;
- die Gallenblase enthielt ein dunkelgrünes, feinkörniges, hochvisköses Exudat;
- Niere und Kopfniere hatten eine schwarzrote Färbung und erschienen atrophiert.

Bei den in der Folgezeit schwer erkrankten und deshalb getöteten Bachforellen wurden diese pathologischen Veränderungen ebenfalls diagnostiziert. Diese Organveränderungen traten bei der Badgruppe nur vereinzelt und in deutlich verminderter Schwere auf. Die Bachforellen, die diesen Zeitraum überlebten, zeigten ab der 16. Woche post appl. einen Genesungsprozess. 20 Wochen post appl. waren kaum noch Organverändungen zu finden. Die Kontrollforellen zeigten zu keinem Zeitpunkt Krankheitszeichen oder pathologische Organveränderungen.

Kinetik der histopathologischen Organveränderungen

Im Expositionsversuch 2005 zeigten sich in Organen von Kontrollforellen zu keinem Zeitpunkt histopathologische Veränderungen. In Organen der Iller-UV-Gruppe waren nur geringgradige Veränderungen in einzelnen Organen einzelner Bachforellen nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigten sich in den Organen der Iller-nativ-Gruppe erste histopathologische Organveränderungen ab der 4. Woche post. appl., die im Verlauf an Schwere deutlich zunahmen (Abb. 10-12).

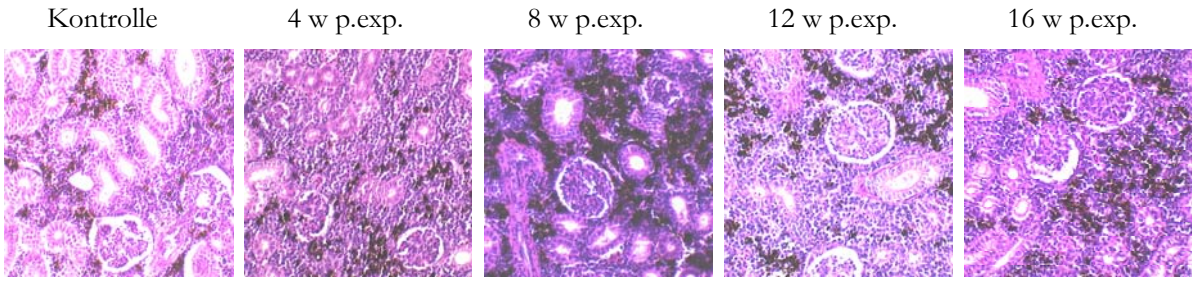


Abb. 10: Im interstitiellen Nierengewebe der Kontrollforellen, das von intakten Tubuli und Glomeruli durchzogen ist, sind zahlreiche Melanomakrophagen eingelagert. In den Nieren von Bachforellen der Iller-nativ-Gruppe wurden ab der 4. Woche post appl. deutliche histologische Veränderungen im interstitiellen Gewebe nachgewiesen, die im Verlauf der Exposition in einer hochgradigen Proliferation der Lymphozyten mündeten.

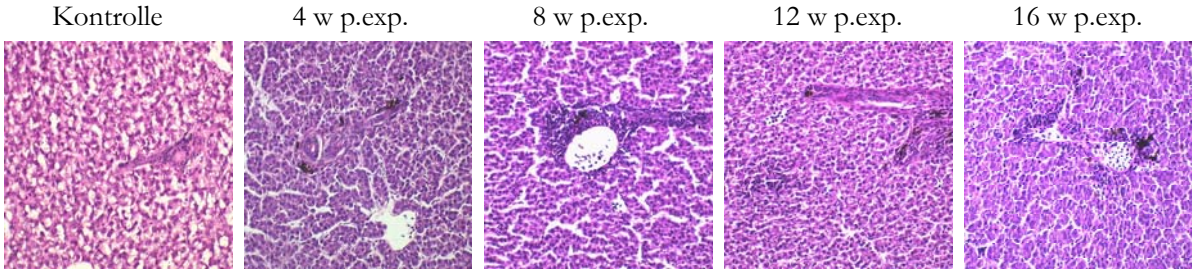


Abb. 11: Das Lebergewebe der Kontrollforellen zeigt histologisch intakte, Glykogen speichernde Hepatozyten und vereinzelte Melanomakrophagen. Bei den Bachforellen der Iller-nativ-Gruppe wurden ab der 8. Woche p.exp. Infiltrationen von Entzündungszellen in den Portalfeldern gefunden. Im weiteren Verlauf waren Entzündungsareale in allen Bereichen der Leber sowie Hepatozytendegenerationen nachzuweisen.

Bei moribunden Forellen waren diese pathologischen Organveränderungen teils so massiv (Abb. 12), dass in diesem Stadium ein mutiples Organversagen auftrat.

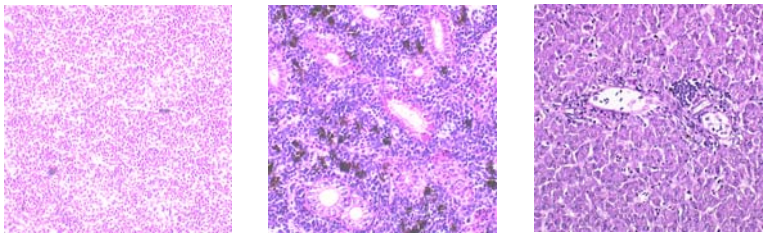


Abb. 12: Im stark bindegewebig durchsetzten Milzgewebe sind keine Melanomakrophagen zu finden. In der Niere traten verstärkt Tubulusepitheldegenerationen und Nekrosen im Interstitium auf. In der Leber waren Hämorrhagien im Bereich der degenerierten Hepatozyten zu finden. Vergrößerung: 100x.

Im Infektionsversuch 2006 waren in den Organen schwer erkrankter Forellen der Oral-Gruppe ähnliche, allerdings nicht so massive, histopathologische Veränderungen wie bei den moribunden Bachforellen der Iller-nativ Gruppe aus dem Expositionsversuch 2005 zu finden. Rekonvaleszente Forellen zeigten solche histopathologischen Veränderungen in den untersuchten Organen nicht oder nicht mehr. In Organen der Bad- bzw. der Kontrollgruppe wurden nur geringe histopathologische Veränderungen festgestellt.
Die Beteiligung des Magen-Darm-Traktes als „Eintrittspforte“ für z.B. infektiöse Mikroorganismen konnte histopathologisch nicht bestätigt werden (Abb. 13).

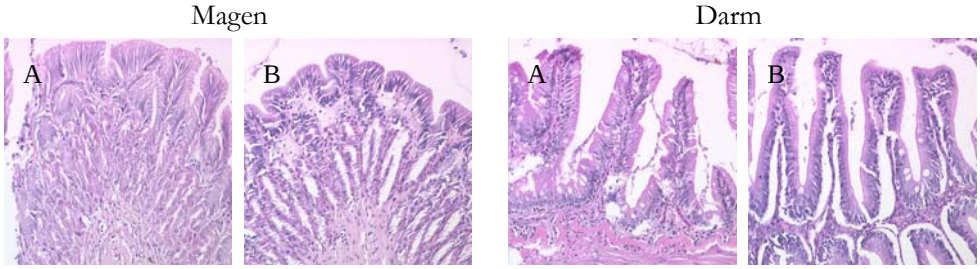


Abb. 13: Vergleichende Histologie von Magen bzw. Darm von gesunden **(A)** und moribunden Bachforellen **(B)**. Es konnten keine Unterschiede zur Histologie der Kontrollgruppe festgestellt werden. Vergrößerung: 25x.

Auch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Darmes zeigten nur ödematöse Veränderungen von Darmepithelzellen, wie sie für Hungerzustände typisch sind.

Veränderungen im Immunsystem

Die Reaktion des Immunsystems im Verlauf der Erkrankung wurde durch Bestimmung des mRNA-Musters wichtiger Regulatormoleküle in Milz, Kopfniere, Niere und Darm untersucht.

In den folgenden Abbildungen sind die Werte der Iller-UV-Gruppe **gelb**, und die Werte der Iller-nativ-Gruppe **grün** dargestellt. Der Kontrollwert 1 der gesunden Bachforellen wurde in einer **roten** Linie abgebildet.
In der Iller-nativ-Gruppe reagieren die Zelloberflächenrezeptoren (TCR, MHC II und CD56) nach teils initialer Stimulation im weiteren Verlauf mit einem deutlichen Abfall. Dies könnte auf die in dieser Gruppe beobachtete Leukopenie zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu sind IL-12 und NKeF über den gesamten Zeitraum erhöht. Beide Zytokine sind für das Überleben bestimmter Lymphozytenpopulationen wichtig und könnten die Gegenregulation zum Lymphozytenverlust reflektieren.
Die erhöhte Expression vom MHC II in der Milz beider Expositionsgruppen deutet auf eine antigene Stimulation im Verlauf der Erkrankung hin (Abb. 14).

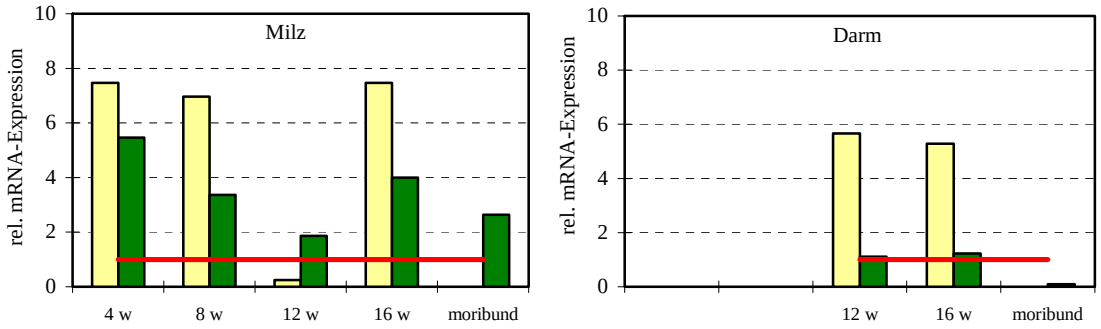


Abb. 14: Relative mRNA-Expression von MHC II im Verlauf des Expositionsversuches 2005.
Im Gegensatz zur Niere und Kopfniere konnte eine konstante Expression in Milz und ab der 12. Woche p. exp. auch im Darm der Forellen der Iller-UV-Gruppe nachgewiesen werden.

Diese antigene Stimulation ist wahrscheinlich auf ein bakterielles Antigen zurückzuführen, wie die starke Aktivierung von IL-12 in der Iller-nativ-Gruppe zeigt (Abb. 15). Auch eine „Reparatur“ starker Lymphozytenverluste kann Ursache dieser erhöhten Expression sein.

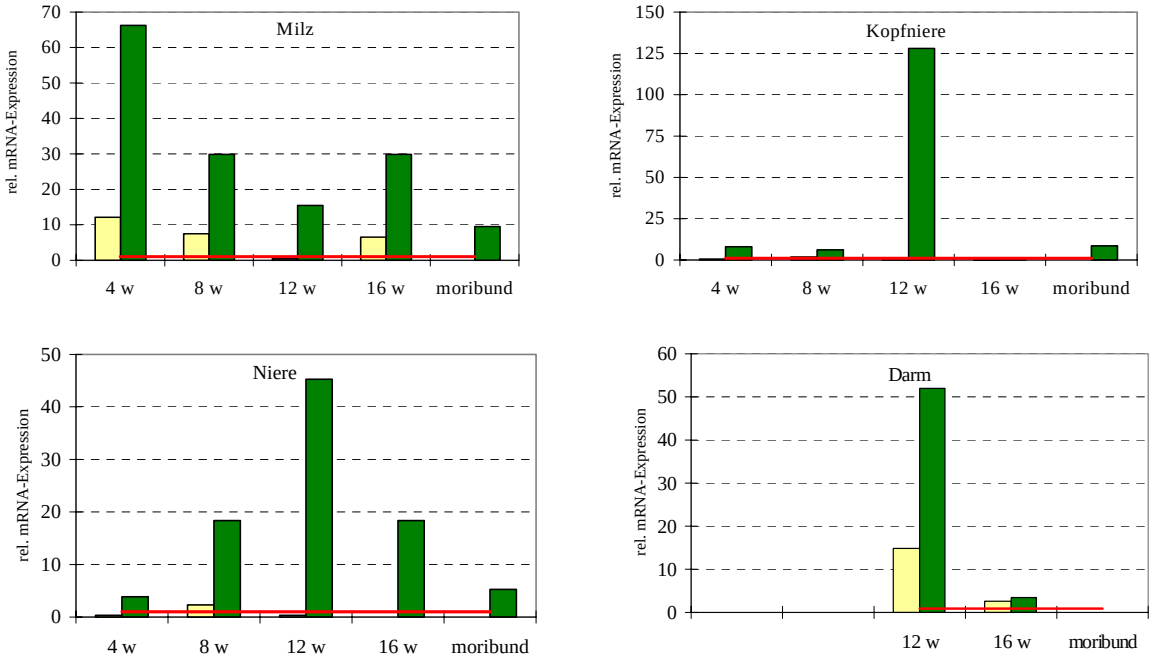


Abb. 15: Relative mRNA-Expression von IL-12 im Verlauf des Expositionsversuches 2005.
In allen Organen der Forellen der Iller-nativ-Gruppe konnte eine erhöhte IL-12-Expression nachgewiesen werden, besonders in der 12. Woche p.exp.

Für eine antigene Stimulation bzw. die Auseinandersetzung mit einem Erreger spricht auch die initial erhöhte Expression von TNFα in Milz und Kopfniere, welches als Marker für eine Aktivierung von Monozyten und Makrophagen gilt (Abb. 16).

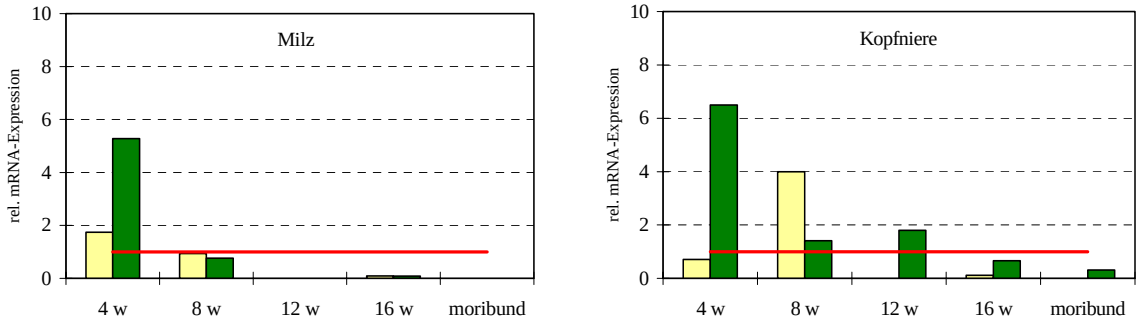


Abb. 16: Relative mRNA-Expression von TNFα im Verlauf des Expositionsversuches 2005.
Bemerkenswert ist die starke Abregulierung des zellulären Aktivierungsmarkers TNFα im Verlauf der Exposition in den Organen Milz, Kopfniere und Darm von Forellen der Iller-nativ-Gruppe.

Die Aktivität von NK-Zellen scheint vor allem in der Endphase der Erkrankung eine Rolle zu spielen, wie die stark erhöhte Expression des Faktors NKeF in der Milz moribunder Bachforellen zeigt (Abb. 17). Möglicherweise ist dies aber auch Ausdruck einer erhöhten Erythrolyse, weil NKeF von Erythrozyten produziert wird.

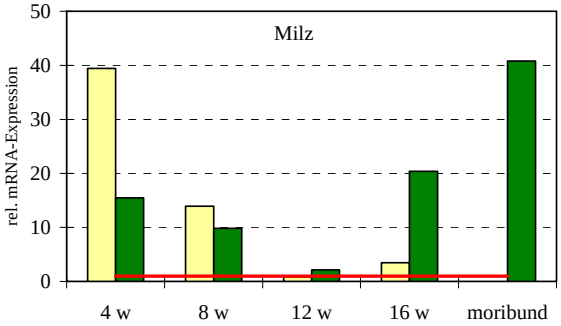


Abb. 17: Relative mRNA-Expression von NKeF im Verlauf des Expositionsversuches 2005.
Auffällig war die erhöhte Expression in der Kopfniere und Niere 12 Wochen p.exp. sowie eine Expression im moribunden Stadium.

Insgesamt ergibt sich das Bild einer initialen Aktivierung von Makrophagen und B-Lymphozyten auf ein möglicherweise bakterielles Antigen sowie einer starke Abnahme von Lymphozyten mit der Gegenregulation durch exprimierte Zytokine zur Aktivierung von Lymphoblasten. Die in moribunden Forellen gemessene starke Expression von NKeF kann sowohl auf eine Aktivierung von NK-Zellen als auch auf eine erhöhte Erythrolyse hindeuten.

Die Suche nach einem Erreger

Auch in den Organproben der Bachforellen aus den Versuchen 2005 und 2006 konnte kein Virus nachgewiesen werden, weder durch Anzucht auf virusempfänglichen Zellen noch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von beimpften virusempfänglichen Zellen. Auch molekularbiologische Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf eine viral bedingte Erkrankung.
In der bakteriologischen Untersuchung von Nieren und Lebern von erkrankten Bachforellen aus dem Übertragungsversuch und danach auch von moribunden Forellen aus dem Expositionsversuch konnte eine gram-negatives Bakterium aus der Familie *Pseudomonadaceae* isoliert werden. Diese Bakterien zeigen stark hämolysierende Wirkung.

Charakterisierung der Bakterienisolate

Die Bakterienisolate wachsen temperaturabhängig gut bei 10-20 °C. Bei 37 °C stoppt das Wachstum. Sie sezernieren bei 15 °C und 20 °C verschiedene Proteine (Abb. 18).

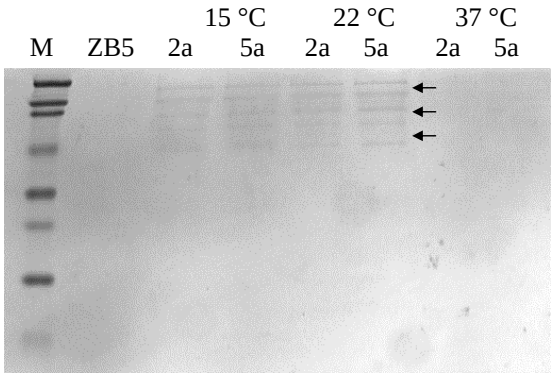


Abb. 18: Nachweis der sezernierten Proteine der Bakterienisolate 2a und 5a nach 48 h-Kultur bei verschiedenen Temperaturen mittels PAGE.
Spur M MW-Marker; Spur ZB5 Kulturmedium
Die Isolate sezernieren mindestens fünf verschiedene Proteine (←).

Die sezernierten Bakterienproteine scheinen zum einen eine Proliferation von Epithelzellen und Leukozyten zu induzieren, zum anderen haben sie eine starke hämolysierende Wirkung (Abb. 19).

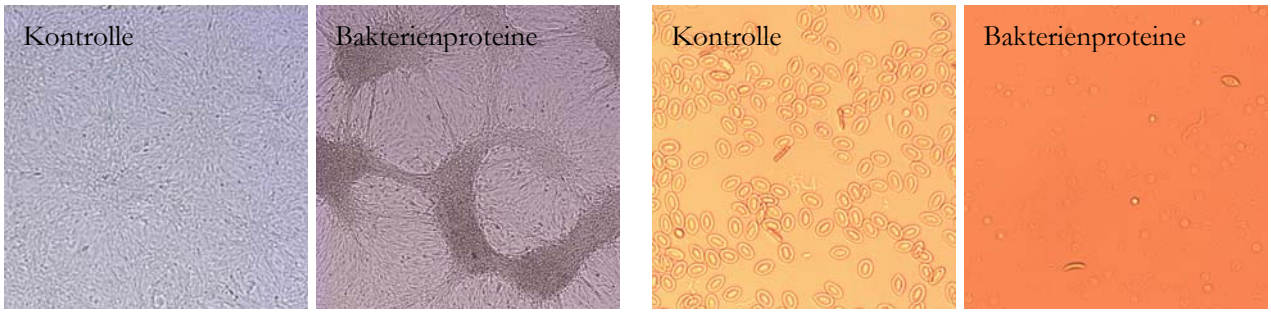


Abb. 19: Wirkung sezernierter Bakterienproteine auf RTG-2-Zellen (links) bzw. Forellenerythrozyten (rechts).
Nach 48 Stunden zeigten sich eindeutige morphologische Veränderungen in den RTG-2-Zellen, die auf die Induktion einer polyklonalen Proliferation hinweisen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Forellenerythrozyten eine stark hämolysierende Wirkung.

<u>Bachforellensterben – zeitliche Abfolge der Erkrankung</u>

Die Kinetik der klinischen Erscheinungen, der histopathologischen Veränderungen in den Organen und der Reaktionen des Immunsystems im Verlauf der Erkrankung belegen einen sehr langsamen, fast chronischen Verlauf der Erkrankung. Die mittlere Inkubationszeit zwischen dem Beginn der Exposition und den ersten Todesfällen von 116 Tagen ist für eine klassische Infektionskrankheit sehr lang (Tab. 3).

Tabelle 3: Besatz und erstes Auftreten von Bachforellensterben in den Expositionsversuchen der Jahre 2001-2006

Versuchsjahr	Besatz	Beginn des Sterbens	Inkubationszeit (Tage)
2001	10.04.	29.08.	141
2002	10.06.	28.09.	108
2003	06.06.	18.08.	74
2004	01.04.	10.09.	158
2004	10.05.	08.09.	116
2005	19.05.	09.09.	112
2006	20.05.	08.09.	106
		mittlere Inkubationszeit (Tage)	**116**

Legt man die Annahme zu Grunde, dass der Besatz der Bachforellen vor oder nach dem Erreichen eine krankheitsauslösenden Dosis des bislang unbekannten Faktors im Flusswasser erfolgte, kann man diese mittlere Inkubationszeit nutzen, um den Termin zu errechnen, an dem die krankheitsauslösende Dosis im jeweiligen Jahr erstmalig erreicht war:

2001 5. Mai
2002 2. Juni
2003 25. April
2004 21. Mai
2005 12. Mai
2006 10. Mai

Die Zusammenstellung von Besatzzeitpunkten und erstem Auftreten von Todesfällen in den Expositionsversuchen an der Iller ergibt ein ziemlich genaues Bild über den begrenzten Zeitraum, in dem eine krankheitsauslösende Dosis eines Faktors im Flusswasser vorhanden ist (Abb. 20).

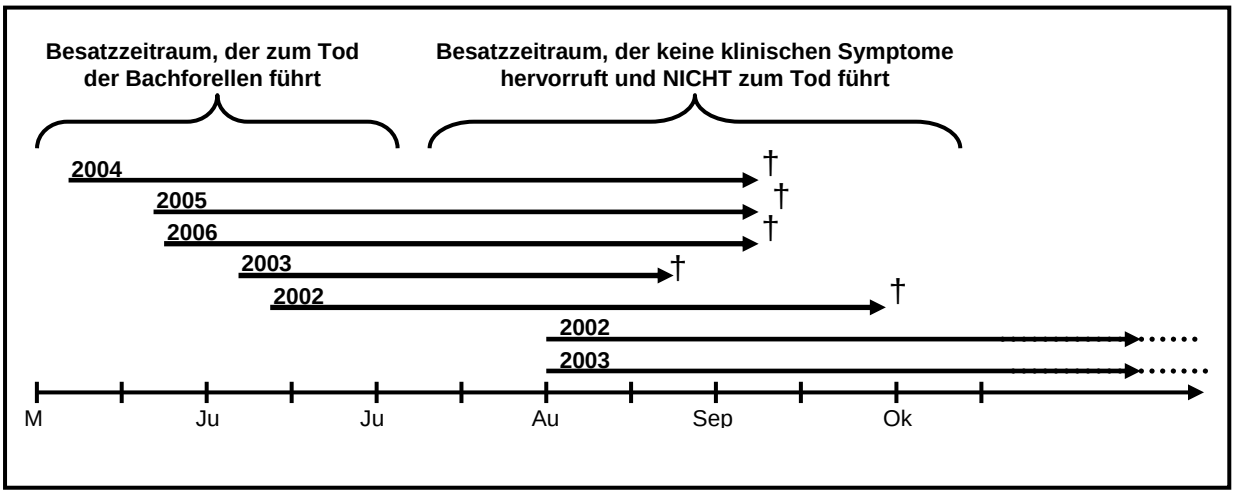
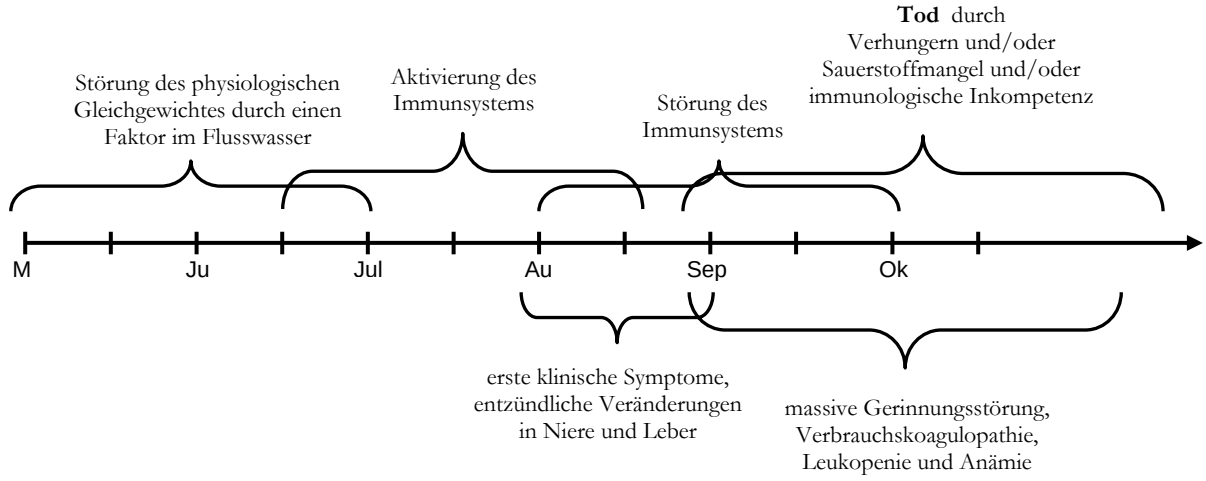


Abb. 20: Zusammenstellung der Besatzzeitpunkte und des Auftretens erster Todesfälle (Expositionsversuche der Jahre 2002-2006).

Der Zeitraum von Anfang Mai bis Ende Juni, in dem eine Exposition von Bachforellen mit unbehandeltem Illerwasser zwangsläufig zum Bachforellensterben führt, wurde in einem Umsetzversuch 2006 weiter eingegrenzt. Forellen, die nur vier Wochen in nativem Illerwasser schwammen, starben Anfang September, andere, die erst Anfang Juli ins Illerwasser gesetzt wurden, überlebten.
Daraus ergibt sich folgende Kinetik der Pathogenese:



Unklar bleibt allerdings, ob der Faktor, der zwischen Ende April und Ende Juni auftritt, chemischer oder biologischer Natur ist.

<u>Ursache für das Bachforellensterben – eine Hypothese</u>
Aus den in den bisherigen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

a) Die Klinik, die histopathologischen Veränderungen in den Organen und die Reaktionslage des Immunsystems im Verlauf der Erkrankung lassen eine multifaktorielle Ursache am wahrscheinlichsten erscheinen.
b) Die nachhaltige Störung des physiologischen Gleichgewichts, z.B. durch toxische Substanzen im Flusswasser, bewirkt eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber schwach- oder fakultativ pathogenen Erregern.
c) Die Ursache dieser Störung tritt zwischen Ende April und Ende Juni in einer krankheitsauslösenden Dosis auf.
d) Die Störung des physiologischen Gleichgewichts ist nicht kompensierbar und wird sehr wahrscheinlich durch die fakultativ pathogenen Bakterien noch verstärkt.

Die eindeutige Bestätigung, dass o.g. Hypothese die Ursachen des Bachforellensterbens beschreibt, erfordert weitere Analysen:

e) Der Faktor, der zwischen Ende April und Ende Juni das physiologische Gleichgewicht der Bachforellen nachhaltig stört, muss eindeutig chemisch/biochemisch/biologisch analysiert werden.
f) Die Bakterien, die zuerst aus moribunden Bachforellen aus dem Infektionsversuch 2006 und danach aus moribunden, Illerwasser-exponierten Bachforellen isoliert wurden, müssen charakterisiert werden. Danach muss in einem Infektionsversuch geprüft werden, ob nach artifizieller Infektion mit den Bakterienisolaten eine Erkrankung auszulösen ist, die der im Freiland beobachteten entspricht. Aus den infizierten und dann erkrankten Bachforellen muss dieses Isolat reisoliert werden können (Koch'sche Postulate).
g) In einem Aquarienversuch sind chemisch oder biochemisch charakterisierte Faktoren dahingehend zu untersuchen, ob sie das physiologische Gleichgewicht der Bachforellen so stören, dass die Tiere eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber fakultativ pathogenen Erregern zeigen.

Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger:

Hantaviren: Entwicklung von serologischen Nachweisverfahren und Untersuchungen zur Verbreitung in Deutschland

Mertens, M., Schmidt-Chanasit, J.[1,2], Essbauer, S.S.[3] und Ulrich, R.*
[1]Institut für Epidemiologie, Wusterhausen, [2]aktuelle Adresse: Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main; [3]Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

Im Jahr 2005 wurde in Deutschland und anderen europäischen Staaten ein dramatischer Anstieg der Zahl der registrierten humanen Hantavirus-Infektionen beobachtet (Mailles et al., 2005). Der Anstieg betraf in Deutschland nicht nur bekannte Endemiegebiete, sondern auch Gebiete mit bisher nur geringen Fallzahlen. Außerdem wurde erstmals über ein gehäuftes Auftreten von Hantavirus-Infektionen in urbanen Gebieten berichtet. Im vorliegenden Beitrag soll eine kurze Zusammenfassung zum gegenwärtigen Stand der Kenntnisse zur Übertragung, Verbreitung und Diagnostik von Hantaviren und den Aktivitäten des Instituts für neue und neuartige Tierseuchenerreger und seiner Kooperationspartner auf dem Gebiet der Hantavirus-Forschung gegeben werden.

Einleitung: Hantaviren – eine Gruppe von Nagetier-assoziierten Zoonoseerregern aus der Familie *Bunyaviridae*

Hantaviren gehören taxonomisch zur Familie *Bunyaviridae* und bilden dort ein separates Genus (Tab. 1). Zur Familie *Bunyaviridae* zählen auch die Genera *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* und *Phlebovirus*, denen eine Reihe von Zoonoseerregern zugeordnet werden. Die Erreger des Krim-Kongo-Hämorrhagischen Fiebers (Krim-Kongo-Hämorrhagisches Fieber Virus, CCHFV) und des Rifttalfiebers (Rifttalfiebervirus, RVFV) verursachten in der Vergangenheit immer wieder Krankheitsausbrüche in der Bevölkerung und bei Haustieren. Zum Genus *Tospovirus* gehören ausschließlich pflanzenpathogene Viren, wie beispielsweise der Erreger der Bronzefleckenkrankheit bei Tomaten (Tomato-Spotted-Wilt-Virus). Außer bei Hantaviren erfolgt die Übertragung der Bunyaviren auf Mensch und Tier durch Arthropoden.

Bunyaviren sind behüllte Viren mit einem segmentierten Negativstrang-RNA-Genom. Die drei Genomsegmente werden nach ihrer Größe als S- (small), M- (medium) und L- (large) Segment bezeichnet. Die Strukturproteine werden von zwei Segmenten kodiert, das Nukleokapsid (N)-Protein vom S-Segment und die Hüllproteine vom M-Segment. Das L-Segment kodiert für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Bei einigen Genera der Bunyaviren wurden zusätzlich überlappende Leserahmen auf S- und M-Segment beschrieben. Auch bei bestimmten Hantaviren befindet sich auf dem S-Segment ein zweiter, die N-Protein-kodierende Sequenz überlappender Leserahmen, über dessen Funktionalität bisher aber nichts bekannt ist.

Hantavirus-Infektionen können beim Menschen zwei unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen, das Hämorrhagische Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) und das Hantavirale Cardiopulmonale Syndrom (HCPS). Die Art und Schwere der klinischen Symptomatik der humanen Infektionen wird maßgeblich durch die Hantavirus-Spezies bestimmt und reicht von klinisch inapparenten Infektionen bis zu tödlichen Verläufen. 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 – ca. 12 %.

Reservoirwirte und Übertragung der Hantaviren

Das natürliche Reservoir für Hantaviren sind wildlebende Nagetiere, die persistent mit dem Virus infiziert sind, jedoch offenbar nicht erkranken. Generell ist eine Hantavirus-Spezies immer eng mit einer Nagetierart oder sehr nahe verwandten Arten der gleichen Gattung assoziiert (Tab. 1). So reflektieren die Verwandtschaftsbeziehungen der Hantaviren die Verwandtschaft der entsprechenden Nagetier-Reservoire (Abb. 1). Beispielsweise werden die nahe verwandten Puumalavirus (PUUV) und Tulavirus (TULV) von Rötelmaus (Abb. 2A) bzw. Feldmaus (Abb. 2B), Vertretern der Unterfamilie Arvicolinae (Wühlmäuse) übertragen. Das Thottapalyamvirus (TPMV) ist das bisher einzige Hantavirus, das nicht von einem Nagetier, sondern einem Vertreter der Ordnung „Insektenfresser" übertragen wird. Diese Verwandtschaftsbeziehungen werden durch eine Koevolutions-Hypothese erklärt. Daneben spielen Wirtswechsel und nachfolgende Adaptation bei der Hantavirus-Evolution eine große Rolle und konnten experimentell nachgestellt werden (Klingström et al., 2002).

Tabelle 1 - Übersicht über die Taxonomie der Familie *Bunyviridae* mit ausgewählten humanpathogenen Erregern

Genus*	Vertreter	Reservoir/ Vektor	Vorkommen (Deutschland)	Erkrankung beim Menschen
Orthobunya-virus	La-Crosse-Virus	verschiedene Säugetier-Arten/ Moskitos	Nordamerika (-)	Enzephalitis
Hantavirus	Sin Nombre virus (SNV)	Hirschmaus	Nordamerika (-)	HCPS
	Andesvirus (ANDV)	Reisratte	Südamerika (-)	HCPS
	Puumalavirus (PUUV)	Rötelmaus	Europa (+)	HFRS (NE)
	Tulavirus (TULV)	Feldmaus	Europa (+)	HFRS ?***
	Prospect Hill-Virus (PHV)	Wiesenwühlmaus	Nordamerika (-)	nicht human-pathogen
	Hantaanvirus (HTNV)	Brandmaus	Asien (-)	HFRS
	Seoulvirus (SEOV)	Haus- und Wanderratte	Asien, Amerika, Europa (?)	HFRS
	Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV)	Brandmaus (DOBV-Aa)	Europa (+)	HFRS
		Gelbhalsmaus (DOBV-Af)	Europa (?**)	HFRS
	Thailandvirus (THAIV)	Bandikutratte	Asien (-)	HFRS?***
	Thottapalyam-virus (TPMV)	Moschusspitzmaus	Asien (-)	?***
Phlebovirus	Rifttalfiebervirus (RVFV)	Wiederkäuer/ Moskitos	Afrika, Naher Osten (-)	Rifttalfieber
Nairovirus	Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV)	Nagetiere, Schafe, Ziegen/ Zecken	Afrika, Südosteuropa (-)	Krim-Kongo-Hämorrhagisches Fieber

HCPS, Hantavirales Cardiopulmonales Syndrom; HFRS, Hämorrhagische Fieber mit renalem Syndrom; NE, Nephropathia epidemica, eine milde Form des HFRS.
*Das Genus *Tospovirus* wurde in der Übersicht nicht berücksichtigt, da es ausschließlich pflanzenpathogene Viren beinhaltet.
**Es gibt einzelne Hinweise zum Vorkommen des Seoulvirus (SEOV) bei Wanderratten in Europa, ohne dass jedoch bisher humane Infektionen mit diesem Virus in Deutschland beobachtet wurden (Ulrich et al., 2004; Heyman et al., 2004).
***Zur Humanpathogenität von TULV, THAIV und TPMV ist bisher nur sehr wenig bekannt.

Die infizierten Nagetiere scheiden das Hantavirus mit Urin, Kot und Speichel aus. Durch Aerosolbildung der kontaminierten Exkremente und deren Inhalation oder durch Biss kann eine Infektion beim Menschen hervorgerufen werden. Kürzlich wurde experimentell eine hohe Stabilität von Hantaviren gezeigt, was auf eine indirekte Übertragung der Viren hinweist (Kallio et al., 2006). Nach bisherigen Daten werden die europäischen und asiatischen Hantaviren ausschließlich von infizierten Nagetieren auf den Menschen übertragen. Lediglich für das hochvirulente südamerikanische ANDV gibt es Hinweise einer Mensch-zu-Mensch-Übertragung (Martinez et al., 2005).
Die geographische Verbreitung der einzelnen Hantavirus-Spezies ist an das Vorkommen der entsprechenden Nagetier-Reservoirwirte gebunden. Lediglich das Ratten-assoziierte Seoulvirus (SEOV) ist auf verschiedenen Kontinenten, z.B. in Nordamerika, Asien und Europa, nachgewiesen worden. Während die Verbreitung von Hantaviren in Amerika, Europa und einigen Teilen Asiens gut dokumentiert ist (siehe Tab. 1), liegen zur Verbreitung von Hantaviren in Afrika und Australien bisher nur vereinzelte Befunde vor (Ulrich et al., 2002). Vor kurzem wurde das erste afrikanische Hantavirus aus einer in Guinea gefangenen Waldmaus (Hylomyscus simus) isoliert (Klempa et al., 2006).

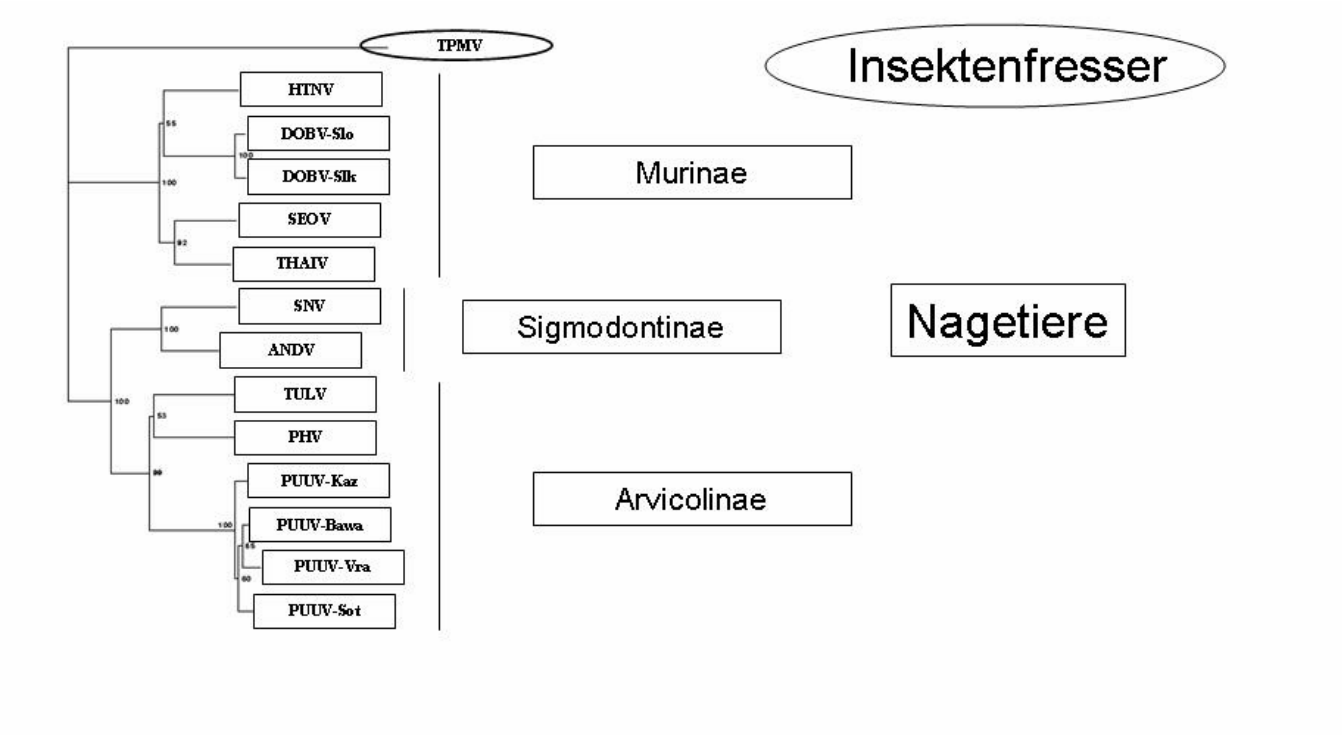


Abb.1: Phylogenetischer Stammbaum von ausgewählten Hantaviren auf der Basis der Nukleokapsidprotein-Aminosäuresequenzen.
Puumalavirus (PUUV), Tulavirus (TULV) und Prospect Hill-Virus (PHV) werden von Vertretern der Unterfamilie Arvicolinae (Wühlmäuse), Sin Nombre-Virus (SNV) und Andesvirus (ANDV) von Vertretern der Unterfamilie Sigmodontinae (Neuweltmäuse und –ratten) und Hantaanvirus (HTNV), Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV), Seoulvirus (SEOV) und Thailandvirus (THAIV) von Vertretern der Unterfamilie Murinae (Echte Mäuse und Ratten) übertragen. Das Thottapalyamvirus (TPMV) ist das einzige Hantavirus, das als Reservoirwirt kein Nagetier sondern einen Vertreter der Insektenfresser hat.

Mertens et al.
Abb. 2A

Mertens et al.
Abb. 2B

Abb. 2: Rötelmaus (A) und Feldmaus (B) sind die Überträger der nahe verwandten Hantaviren Puumalavirus (PUUV) und Tulavirus (TULV). Die Fotos wurden freundlicherweise von Hans-Joachim Pelz (BBA Münster) zur Verfügung gestellt.

Hantavirus-Infektionen in Deutschland

Mit dem Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) am 1. Januar 2001 sind in Deutschland labordiagnostische Nachweise von Hantavirus-Infektionen meldepflichtig. In den Jahren 2001-2006 wurden in Deutschland insgesamt 1.319 Hantavirus-Infektionen gemeldet (Stand 31.01.2007; siehe Tab. 2). Während in den Jahren 2001-2004 jährlich zwischen 140 und 240 Infektionen gemeldet wurden, zeigte sich im Verlauf des Jahres 2005 ein starker Anstieg der Zahl der Erkrankungen (n=448). Unter den Erkrankten wohnten auffällig viele Personen in Großstädten, während zuvor die Infektionen überwiegend in ländlichen Gebieten beschrieben worden waren (Koch, 2006). Im Verlauf des Jahres 2006 lag das Infektionsniveau dagegen wieder deutlich niedriger (n=72; Stand vom 31.01.2007).

Tabelle 2 – Zahl der in den Jahren 2001 bis 2006 in Deutschland gemeldeten Hantavirus-Infektionen nach Bundesländern (Robert-Koch-Institut, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006 und SurvStat, www3.rki.de, Datenstand: 31.01.2007).

Bundesland	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Baden-Württemberg	59	164	65	120	110	22
Bayern	29	17	18	61	41	12
Berlin	0	1	0	1	2	0
Brandenburg	0	0	1	0	3	1
Bremen	1	0	0	1	0	0
Hamburg	1	0	0	0	1	0
Hessen	21	8	13	5	34	4
Mecklenburg-Vorpommern	4	8	4	4	4	1
Niedersachsen	11	5	3	11	75	6
Nordrhein-Westfalen	51	19	30	29	143	18
Rheinland-Pfalz	2	2	3	3	10	2
Saarland	1	0	0	0	0	0
Sachsen	0	1	0	2	2	1
Sachsen-Anhalt	2	1	3	2	2	0
Schleswig-Holstein	0	1	1	2	7	5
Thüringen	3	1	3	1	14	0
Gesamt	**185**	**228**	**144**	**242**	**448**	**72**

In den Jahren 2001-2004 und 2006 wurden die meisten Fälle aus Baden-Württemberg übermittelt (Tab. 2). Dort befindet sich auf der Schwäbischen Alb ein bereits seit langer Zeit bekanntes Endemiegebiet für Hantavirus-Infektionen (Pilaski et al., 1991; Zöller et al., 1995). Im Jahr 2004 wurde erstmals seit Einführung der Meldepflicht eine Häufung von Hantavirus-Erkrankungen in östlichen Landkreisen Niederbayerns beobachtet (Hautmann et al., 2005). Die im Jahr 2005 deutschlandweit erhöhte Zahl an Infektionen zeigte sich insbesondere in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen und Hessen (Tab. 2). Mehr als die Hälfte der in Niedersachsen übermittelten Fälle stammten aus der Stadt und

dem Landkreis Osnabrück. In Nordrhein-Westfalen wurden die meisten Fälle im Regierungsbezirk Köln registriert.
In Deutschland sind Infektionen mit drei humanpathogenen Hantavirus-Spezies nachgewiesen worden (Tab. 1), die zu unterschiedlich schweren Verläufen des HFRS führen können. Todesfälle, die ursächlich auf eine Hantavirusinfektion zurückgeführt werden können, sind in Deutschland bisher nicht bekannt (Krüger et al., 2002; Ulrich et al., 2004). Die Mehrzahl der humanen Infektionen wird in Deutschland durch das PUUV verursacht. Eine zweite in Nord- und Nordostdeutschland verbreitete Hantavirus-Art ist das Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV), das wahrscheinlich von der Brandmaus übertragen wird (DOBV-Aa). Inwieweit möglicherweise auch Gelbhals- und Waldmaus Überträger des DOBV in Deutschland sind, bleibt zu prüfen (Ulrich et al., 2006a). Ein drittes, in Deutschland vorkommendes Hantavirus ist das TULV, über dessen Verbreitung und Humanpathogenität bisher wenig bekannt ist.

Gegenwärtiger Stand der serologischen Hantavirus-Diagnostik
Während Hantavirus-Infektionen in den jeweiligen Nagetier-Reservoiren persistieren, kommt es bei humanen Infektionen nur zu einer kurzzeitigen Virämie. Aus diesem Grunde basiert die Diagnostik von Hantavirus-Infektionen beim Menschen vor allem auf serologischen Methoden. Daneben sind in jüngster Zeit auch hochempfindliche Methoden zum Hantavirus-Nukleinsäurenachweis (real-time reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion) entwickelt worden (Aitichou et al., 2006; Maes et al., 2006).
Als klassische serologische Tests werden indirekte Immunfluoreszenztests (IFT) mit Hantavirus-infizierten Säugerzellkulturen eingesetzt. Um eine hochsensitive Diagnostik damit durchführen zu können, sollten IFT für alle in Betracht kommenden Hantaviren durchgeführt werden (Abb. 3).

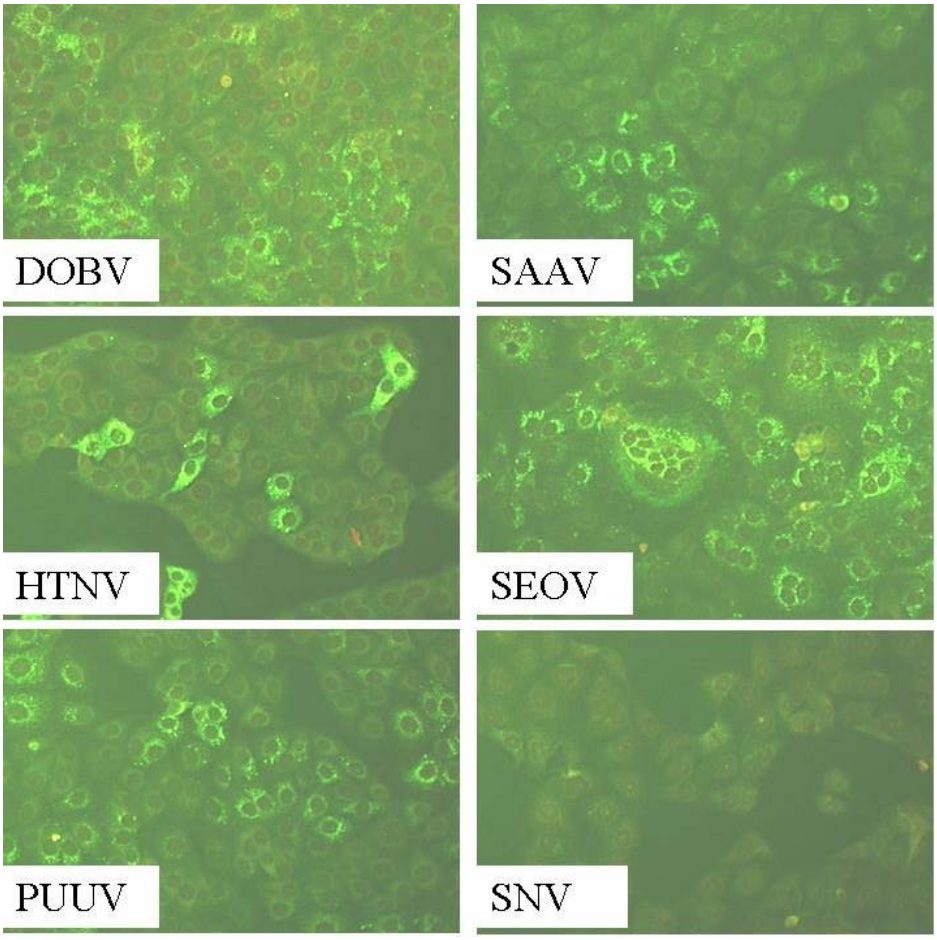


Abb. 3: Analyse der Reaktivität des Serums eines Dobrava-Belgrad-Virus-infizierten Patienten in einem kommerziellen indirekten IgG-Immunfluoreszenztest mit Vero E6-Zellen, die mit unterschiedlichen Hantaviren infiziert sind. DOBV, Dobravavirus (DOBV-Af); SAAV, Saaremaavirus; HTNV, Hantaanvirus; SEOV, Seoulvirus; PUUV, Puumalavirus, SNV, Sin Nombre-Virus. Das Patientenserum zeigte eine typische zytoplasmatische Immunfluoreszenz mit DOBV, SAAV, HTNV, SEOV und PUUV, jedoch nicht mit SNV.

Als Alternative zu IFT sind Enzymimmunoassays (EIA) auf der Basis von inaktivierten Viruslysaten entwickelt worden. Um Probleme bei der Herstellung der diagnostischen Antigene in L3-Sicherheitslaboren zu umgehen, wurden rekombinante Antigene oder synthetische Peptide für die serologische Diagnostik generiert. Zur Herstellung rekombinanter Antigene ist vor allem das immundominante N-Protein verwendet worden. Gegenwärtig werden neben IFT unterschiedliche EIA-Formate und Immunoblots (Western blots, Strip blots, Line Assays) in der Hantavirusdiagnostik eingesetzt (Sjölander et al., 1997; Meisel et al., 2006). Als Schnelltests für die serologische Diagnostik wurden immunchromatographische Tests entwickelt (Hujakka et al., 2003).
Die Typisierung von Hantavirus-Infektionen basiert ebenfalls meist auf serologischen Verfahren. Dazu werden insbesondere Neutralisationstests unter Verwendung verschiedener Hantavirus-Spezies herangezogen (Lundkvist et al., 1997). Als Alternativen für die Typisierung wurden Tests auf der Basis aminoterminal verkürzter N-Proteine (Araki et al., 2001) bzw. Pseudotypen von vesikulärem Stomatitisvirus mit Hantavirus-Hüllproteinen entwickelt (Ogino et al., 2003).

Herstellung Hantavirus-spezifischer monoklonaler Antikörper mittels eines Trägersystems auf der Basis Virus-ähnlicher Partikel

In der Virologie sind mAk für unterschiedliche diagnostische und therapeutische Anwendungen und für Pathogenese-Untersuchungen (z.B. mittels Immunhistochemie) einsetzbar. Beispielsweise können auf der Basis von mAk hochsensitive kompetitive und Fang-EIA etabliert werden.
Kürzlich wurde ein Trägersystem auf der Basis Virus-ähnlicher Partikel (virus-like particles, VLPs) entwickelt, das die Herstellung Sequenz-spezifischer mAk erlaubt (Zvirbliene et al., 2006). Dieses System basiert auf dem Assembly des in der Hefe *S. cerevisiae* synthetisierten Hauptkapsidproteins VP1 des Hamsterpolyomavirus (Sasnauskas et al., 1999). Das VP1 erlaubt den Einbau von Fremdproteinabschnitten unterschiedlicher Länge und Herkunft an definierten Orten, ohne dass die Bildung von VLPs behindert wird (Gedvilaite et al., 2000, 2004). An bestimmten Oberflächen-exponierten Orten des VP1 konnten 120 Aminosäuren-lange Fremdsequenzen inseriert werden. An einer Position des VP1 wurde ein vollständiges grün-fluoreszierendes Protein (GFP) eingebaut, das die Reinigung von chimären VLPs erleichterte (Gedvilaite et al., 2006). Die chimären VLPs sind hochimmunogen und können auch bei Adjuvanz-freier Applikation eine starke Antikörperantwort induzieren (Gedvilaite et al., 2004). Durch Verwendung von VP1-VLPs mit Insertion der amino-terminalen, 120 Aminosäuren-langen Region des PUUV-N-Proteins wurden die murinen mAk 2C6, 7A5, 5E11 und 5C5 generiert. Die Antikörper 7A5, 5E11 und 5C5 reagierten nicht nur mit dem homologen, d.h. für die Herstellung verwendeten PUUV-Vra-Antigen, sondern zeigten auch eine Kreuzreaktivität mit N-Proteinen anderer PUUV-Stämme und anderer Hantavirus-Spezies (siehe Abb. 4C). Kompetitions- und Epitopmappingstudien zeigten, dass die mAk gegen unterschiedliche Regionen am Amino-Terminus des PUUV-N-Proteins gerichtet sind. Die Epitope der mAk 2C6, 5E11 und 5C5 konnten am amino-terminalen, 45 Aminosäuren-langen Ende des N-Proteins kartiert werden, während der mAk 7A5 in der Region zwischen den Aminosäuren 75 und 120 bindet (Zvirbliene et al., 2006). Die mAk reagierten nicht nur mit rekombinanten Antigenen in EIA und Western blot, sondern detektierten auch nativ gefaltetes Antigen in Virus-infizierten Zellen. Gegenwärtig wird geprüft, ob diese Antikörper auch für eine Anwendung in der Immunhistochemie, z.B. an Nagetier-Gewebeschnitten, geeignet sind.

Rekombinante Hefe-exprimierte Nukleokapsid-Proteine für diagnostische Anwendungen

Neue Möglichkeiten für die Entwicklung serologischer Diagnostikverfahren haben sich aus der Etablierung eines hocheffizienten Systems für die Fremdproteinsynthese in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ergeben (Sasnauskas et al., 1999). Dieses Expressionssystem ist bereits erfolgreich für die Herstellung von N-Proteinen verschiedener Viren eingesetzt worden. So wurden beispielsweise unter Verwendung dieses Systems rekombinante Nukleokapsid-ähnliche Partikel von verschiedenen Paramyxoviren generiert (Juozapaitis et al., 2006).
Trotz der starken Kreuzreaktivität von N-Proteinen verschiedener, insbesondere nahe verwandter Hantaviren haben serologische Untersuchungen gezeigt, dass insbesondere während der Akutphase der Infektion Seren mit geringer Kreuzreaktivität nicht durch heterologes Antigen erfasst werden (Elgh et al., 1998). Um Hantavirus-Infektionen mit einer hohen Sensitivität nachweisen zu können, wurden von uns deshalb die N-Proteine europäischer Hantaviren (verschiedene PUUV-Stämme, DOBV), amerikanischer Hantaviren (SNV und ANDV) und asiatischer Hantaviren (Hantaanvirus und SEOV) in Hefezellen hergestellt (Dargeviciute et al., 2002; Razanskiene et al., 2004; Schmidt et al., 2005a,b, 2006; siehe Tab. 3). Da es bei den N-Protein-kodierenden Sequenzen von PUUV-Stämmen große Sequenzunterschiede gibt,

haben wir als Beispiel für einen Stamm aus Deutschland die N-Protein-kodierende Sequenz von PUUV-Bawa, der einen Ausbruch in Niederbayern im Jahre 2004 verursacht hat (Essbauer et al., 2006), in den Hefevektor pFX7-His kloniert. Dieses Expressionsplasmid erlaubt die Synthese von N-Proteinen mit einem Hexahistidin-Motiv am Amino-Terminus (Abb. 4A), das für die Affinitätsreinigung des Proteins verwendet wird. Zur Komplettierung unseres Panels an rekombinanten Proteinen wurden auch die N-Proteine des europäischen TULV, des amerikanischen Prospect Hill-Virus (PHV) und der asiatischen Thailandvirus (THAIV) und TPMV in Hefe synthetisiert (Tab. 3).
Die mittels Nickelchelatchromatografie gereinigten N-Proteine von PUUV-Bawa, TULV und das Kontrollprotein von PUUV-Vra wurden in der SDS-Polyacrylamidgelektrophorese aufgetrennt und zeigten nach Coomassieblau-Färbung Banden des erwarteten Molekulargewichts (Abb. 4B). Interessanterweise zeigte eine vergleichende Untersuchung der beiden PUUV-N-Proteine im Western blot unterschiedliche Reaktivitätsmuster für die mAk 2C6 und 5A3 (Abb. 4C). Diese unterschiedlichen Reaktivitäten können auf einen einzelnen Aminosäureunterschied in der amino-terminalen Region des N-Proteins zurückgeführt werden (Abb. 5), der bereits bei vorhergehenden Untersuchungen als Ursache für fehlende Reaktivitäten bestimmter mAk identifiziert worden war (Lundkvist et al., 2002).

Tabelle 3 – Übersicht über die rekombinant hergestellten Hantavirus-Nukleokapsid-Proteine

Virus-Spezies	Stamm	Nukleokapsidprotein		Referenz
		Länge (Amino-säuren)	Vorhergesagtes Molekulargewicht (kDa)	
SNV	3H226	428	48,1	Schmidt et al., 2005a
ANDV	AH-1	428	48,0	Schmidt et al., 2006
PUUV	Vranica/Hällnäs (PUUV-Vra)	433	49,5	Dargeviciute et al., 2002
	Sotkamo	433	49,5	Razanskiene et al., 2004
	Kazan	433	49,5	Razanskiene et al., 2004
	Bawa (PUUV-Bawa)	433	49,5	Mertens et al., in Vorbereitung
TULV	Moravia	429	48,4	Mertens et al., in Vorbereitung
PHV	PH-1	433	49,0	Unveröffentlicht
HTNV	Fojnica	429	48,2	Razanskiene et al., 2004
SEOV	80-39-B	429	48,1	Schmidt et al., 2005b
DOBV	DOBV-Aa-Slovakia	429	48,3	Razanskiene et al., 2004
DOBV	DOBV-Af-Slovenia	429	48,1	Razanskiene et al., 2004
THAIV	Thai749	429	48,2	unveröffentlicht
TPMV	VRC-66412	435	48,9	unveröffentlicht

SNV, Sin Nombre-Virus; ANDV, Andesvirus; PUUV, Puumalavirus; TULV, Tulavirus; PHV, Prospect Hill-Virus; SEOV, Seoulvirus; DOBV, Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV-Aa: Apodemus agrarius-assoziiertes DOBV; DOBV-Af, A. flavicollis-assoziiertes DOBV); THAIV, Thailandvirus; TPMV, Thottapalyamvirus.

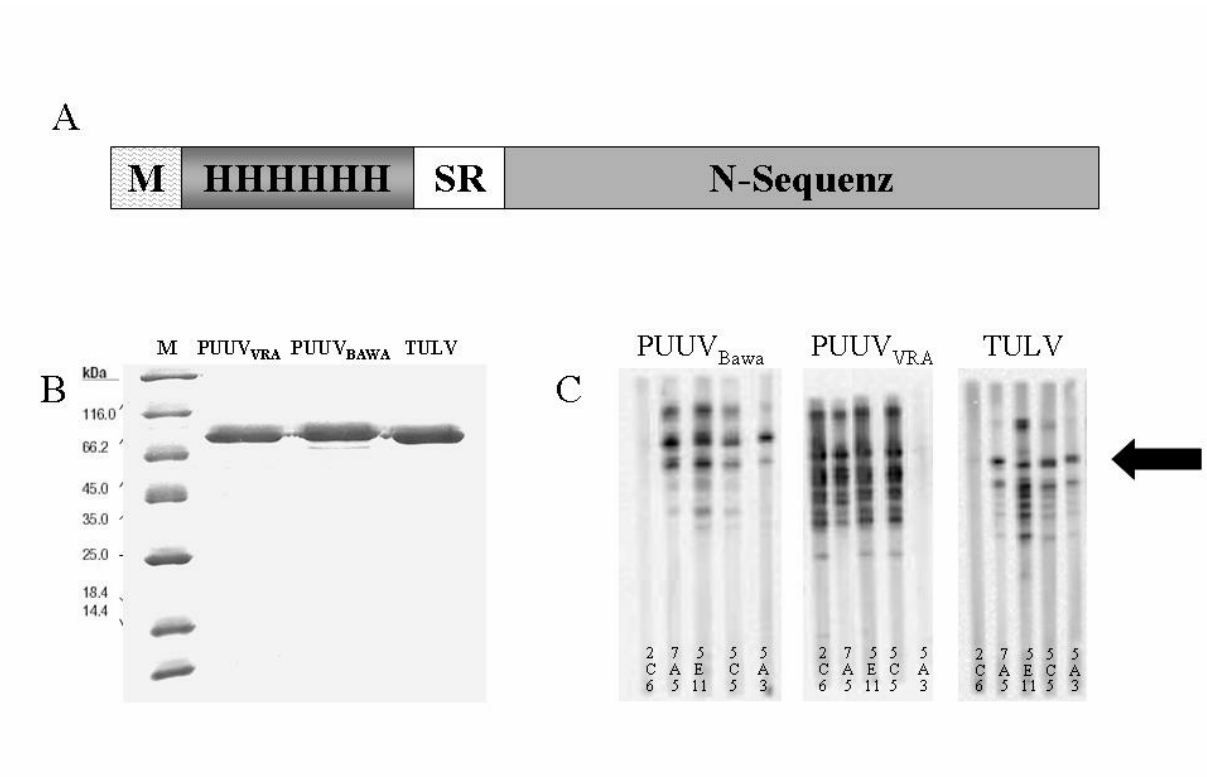


Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur eines in Hefe synthetisierten Hantavirus-Nukleokapsid-Proteins (A), Nachweis der gereinigten Proteine der PUUV-Stämme Vranica-Hällnäs (PUUV-Vra) und Bawa (PUUV-Bawa) und Tulavirus (TULV) in Coomassieblau-gefärbten SDS-PAGE (B) und Western Blot-Analyse dieser Proteine mit Nukleokapsidprotein-spezifischen monoklonalen Antikörpern (C).
Die rekombinanten Nukleokapsidproteine enthalten hinter dem Methionin-Rest (M) 6 Histidin-Reste (H) für die Reinigung mittels Affinitätschromatographie. Die Serin-Arginin-Linker (SR)-kodierende Sequenz beinhaltet den unikalen XbaI-Klonierungsort für die N-Protein-kodierende Sequenz.
Die monoklonalen Antikörper 2C6, 7A5, 5E11 und 5C5 wurden durch Immunisierung von Labormäusen mit chimären Virus-ähnlichen Partikeln, die ein 120 Aminosäuren-langes amino-terminales Segment des PUUV-Vra-Nukleokapsidproteins tragen, hergestellt (Zvirbliene et al., 2006). Der monoklonale Antikörper 5A3 ist aus experimentell PUUV-infizierten Rötelmäusen gewonnen worden (Lundkvist et al., 2002). Die Position der Proteinbanden mit dem erwarteten Molekulargewicht ist durch einen Pfeil markiert. Neben dieser Bande wurden mit den monoklonalen Antikörpern auch kleinere und größere Proteinprodukte (Abbauprodukte, Aggregate) nachgewiesen.

Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“: Monitoring von Hantavirus-Infektionen und Ausbruchsuntersuchungen

Zur geografischen Verbreitung und Häufigkeit von Hantavirus-Infektionen bei Nagetieren in Deutschland liegen bisher nur wenige Daten vor, die sich vor allem auf PUUV und TULV beziehen. Außerdem fehlen bisher Daten zu einem möglichen Zusammenhang der lokalen Populationsdichte von Nagetier-Reservoirs und der Häufigkeit humaner Hantavirus-Infektionen. Diese Vermutung beruht auf Untersuchungen in Skandinavien und den USA, die einen Zusammenhang zwischen einer starken Vermehrung bestimmter Nagetiere (Hantavirus-Reservoirs) und dem Auftreten von Hantavirus-Infektionen beim Menschen aufzeigten (Niklasson et al., 1995; Hjelle and Glass, 2000).
Um möglichen Zusammenhängen zwischen der Populationsentwicklung bei Nagetieren, der Verbreitung und genetischen Veränderung von Hantaviren und anderen Nagetier-assoziierten Zoonoseerregern sowie den Konsequenzen für die Infektionsgefährdung der Bevölkerung nachzugehen, wurde mit dem Aufbau eines Netzwerkes „Nagetier-übertragene Pathogene“ begonnen. Hauptziel dieses Netzwerkes ist die Schaffung einer Plattform für eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Fachleuten verschiedener Fachrichtungen zu unterschiedlichen Aspekten der Biologie der Nagetiere und assoziierter Pathogene.
Eine seit dem Jahr 2001 laufende Pilotstudie zur Verbreitung und Häufigkeit von Hantavirus-Infektionen im Land Brandenburg zeigte an drei von zehn Fangorten ein stabiles Vorkommen von TULV-infizierten

Nagetieren. Molekularbiologische Untersuchungen ergaben, dass das TULV in Brandenburg nicht nur in der Feldmaus (*Microtus arvalis*), sondern auch in der Erdmaus (*M. agrestis*) vorkommt. Weiterführende Untersuchungen sollen jetzt die Evolution der Assoziation des TULV mit den beiden Reservoirwirten genauer charakterisieren (Schmidt-Chanasit et al., in Vorbereitung).

Ein zweiter Schwerpunkt der bisherigen Untersuchungen bestand in der Aufklärung der Ursachen des gehäuften Auftretens humaner Hantavirus-Infektionen in Niederbayern (2004), der Stadt Köln (2005) und der Stadt und dem Landkreis Osnabrück (2005). Für alle drei Regionen konnte in Übereinstimmung mit Untersuchungen an den Patienten gezeigt werden, dass die Infektionen durch PUUV-infizierte Rötelmäuse verursacht worden waren. Serologische und molekularbiologische Verfahren führten zum Nachweis einer hohen PUUV-Durchseuchung in lokalen Rötelmauspopulationen (bis zu ca. 60% PUUV-positive Tiere). Weitergehende phylogenetische Untersuchungen bestätigten das Vorkommen von drei unterschiedlichen PUUV-Stämmen, die sich genetisch deutlich voneinander unterscheiden (Essbauer et al., 2006; Ulrich et al., 2006b).

Ausblick

Unsere zukünftigen Aktivitäten werden sich auf den weiteren Ausbau des Netzwerkes „Nagetier-übertragene Pathogene" konzentrieren. Dazu wird das Hantavirus-Monitoring-Programm in den bisherigen Ausbruchsgebieten (Niederbayern, Köln, Osnabrück) fortgesetzt und, neben dem Land Brandenburg, auf weitere Bundesländer ausgeweitet. Außerdem ist vorgesehen, die Untersuchungen in diesen Regionen, in enger Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen, auf weitere Nagetier-assoziierte Pathogene auszuweiten. Im Falle eines erneuten Anstieges der Zahl der humanen Hantavirus-Infektionen in diesem Jahr soll in intensiver Zusammenarbeit mit den zuständigen Gesundheitsbehörden an der Aufklärung der Ursachen der Ausbrüche gearbeitet werden.
Auf der Basis der hier beschriebenen rekombinanten N-Proteine und mAk werden neue serologische Diagnostikverfahren entwickelt und für ihre Anwendung an Human- und Nagetierseren validiert. Die entwickelten Tests können dann für zukünftige seroepidemiologische Untersuchungen eingesetzt werden. Für Untersuchungen von Pathogenesemechanismen sollen insbesondere Methoden für den Hantavirus-Nachweis in natürlich und experimentell infizierten Nagetieren etabliert werden.

Danksagung

Die Untersuchungen im Labor von Rainer G. Ulrich wurden im Rahmen eines Forschungsvorhabens für den Sanitätsdienst der Bundeswehr (M / SAB1 / 5 / A017) durchgeführt. Wir möchten allen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere den am „Arbeitskreis Mäuse" und Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene" Beteiligten, herzlich danken, die durch die Bereitstellung von Nagetier-Proben, ihre Mithilfe bei Fang und Sektionen oder der Analyse von Nagetier-Proben sowie durch Bereitstellung von Antikörpern und Antiseren zum bisherigen Erfolg unserer Untersuchungen beigetragen haben.

Literatur

Aitichou, M., S.S. Saleh, A.K. McElroy, C. Schmaljohn und M.S. Ibrahim. 2005. Identification of Dobrava, Hantaan, Seoul, and Puumala viruses by one-step real-time RT-PCR. J. Virol. Methods **124:**21-26.

Araki, K., K. Yoshimatsu, M. Ogino, H. Ebihara, A. Lundkvist, H. Kariwa, I. Takashima und J. Arikawa 2001. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections. J. Clin. Microbiol. **39:**2397-2404.

Dargeviciute, A., K. Brus Sjölander, K. Sasnauskas, D.H. Krüger, H. Meisel, R. Ulrich, Å. Lundkvist. 2002. Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. Vaccine **20:**3523-3531.

Essbauer, S., J. Schmidt, F.J. Conraths, R. Friedrich, J. Koch, W. Hautmann, M. Pfeffer, R. Wölfel, J. Finke, G. Dobler und R. Ulrich. 2006. A new Puumala hantavirus subtype in rodents associated with an outbreak of Nephropathia epidemica in South-East Germany in 2004. Epidemiol. Infection **134:**1333-1344.

Gedvilaite, A., C. Frömmel, K. Sasnauskas, B. Micheel, M. Özel, O. Behrsing, J. Staniulis, B. Jandrig, S. Scherneck und R. Ulrich. 2000. Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. Virology **273:**21-35.

Gedvilaite, A., A. Zvirbliene, J. Staniulis, K. Sasnauskas, D.H. Krüger und R. Ulrich. 2004. Segments of Puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice. Viral Immunol. **17:**51-68.

Gedvilaite, A., D.C. Dorn, K. Sasnauskas, G. Pecher, A. Bulavaite, R. Lawatscheck, J. Staniulis, T. Dalianis, T. Ramqvist, G. Schönrich, M.J. Raftery, und R. Ulrich. 2006. Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. Virology **354:**252-260.

Hautmann, W., S. Essbauer und R. Ulrich. 2005. Gehäuftes Auftreten von klinisch apparenten Hantavirus-Infektionen in Niederbayern im Jahr 2004. Epidemiologisches Bulletin **10:**84-85.

Heyman, P., A. Plyusnina, P. Berny, C. Cochez, M. Artois, M. Zizi, J.P. Pirnay und A. Plyusnin. 2004. Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **23:**711-717.

Hjelle, B. und G.E. Glass. 2000. Outbreak of hantavirus infection in the Four Corners region of the United States in the wake of the 1997-1998 El Nino-southern oscillation. J. Infect. Dis. **181 :**1569-1573.

Hujakka, H., V. Koistinen, I. Kuronen, P. Eerikainen, M. Parviainen, A. Lundkvist, A. Vaheri, O. Vapalahti und A. Narvanen. 2003. Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test. J. Virol. Methods **108:**117-122.

Juozapaitis, M., A. Serva, A. Žvirbliene, R. Slibinskas, J. Staniulis, K. Sasnauskas, B.J. Shiell, L. Wang und W.P. Michalski. 2006. Generation of henipavirus nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Virus Res. (im Druck).

Kallio, E.R., J. Klingstrom, E. Gustafsson, T. Manni, A. Vaheri, H. Henttonen, O. Vapalahti und A. Lundkvist. 2006. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. J. Gen. Virol. **87:**2127-34

Klempa, B., E. Fichet-Calvet, E. Lecompte, B. Auste, V. Aniskin, H. Meisel, C. Denys, L. Koivogui, J. ter Meulen, D.H. Kruger. 2006. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. Emerg. Infect. Dis. **12:**838-840.

Klingström, J., P. Heyman, S. Escutenaire, K.B. Sjölander, F. De Jaegere, H. Henttonen, Å. Lundkvist. 2002. Rodent host specificity of European hantaviruses: evidence of Puumala virus interspecific spillover. J. Med. Virol. **68:**581-588.

Koch, J. 2006. Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Hantavirus-Erkrankungen im Zeitraum 2001 bis 2005. Epidemiolog. Bulletin **40, 6.10.06 8**,1-3.

Krüger, D.H., R. Ulrich, M. Schütt und H. Meisel. 2002. „Emerging viruses“: Hantavirus-Infektionen als Ursache des akuten Nierenversagens. Deutsches Ärzteblatt **99:**A645-651.

Lundkvist, A., M. Hukic, J. Horling, M. Gilljam, S. Nichol und B. Niklasson. 1997. Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. J. Med. Virol. **53:**51-59.

Lundkvist, Å. H. Meisel, D. Koletzki, H. Lankinen, F. Cifire, A. Geldmacher, C. Sibold, P. Gött, P., A. Vaheri, D.H. Krüger, und R. Ulrich. 2002. Mapping of B-cell epitopes in the nucleocapsid protein of Puumala hantavirus. Viral Immunol. **15:**177-192.

Maes, P., S. Li, J. Verbeeck, E. Keyaerts, J. Clement und M. Van Ranst. 2006. Evaluation of the efficacy of disinfectants against Puumala hantavirus by real-time RT-PCR. J. Virol. Methods (in press).

Mailles, A., M. Abu Sin, G. Ducoffre, P. Heyman, J. Koch und H. Zeller. 2005. Larger than usual increase in cases of hantavirus infections in Belgium, France and Germany, June 2005. Eurosurveillance Weekly **10:**10-18. http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050721.asp

Martinez, V.P., C. Bellomo, J. San Juan, D. Pinna, R. Forlenza, M. Elder und P.J. Padula. 2005. Person-to-person transmission of Andes virus. Emerg Infect Dis. **11:**1848-1853.

Meisel, H., A. Wolbert, A. Razanskiene, A. Marg, A. Kazaks, K. Sasnauskas, G. Pauli, R. Ulrich und D.H. Krüger. 2006. Development of novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassays based on recombinant Puumala and Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins. Clin. Vaccine Immunol. **13:**1349-1357.

Niklasson, B., B. Hornfeldt, Å. Lundkvist, S. Bjorsten und J. Leduc. 1995. Temporal dynamics of Puumala virus antibody prevalence in voles and of nephropathia epidemica incidence in humans. Am. J. Trop. Med. Hyg. **53:**134-140.

Ogino, M., H. Ebihara, B.H. Lee, K. Araki, A. Lundkvist, Y. Kawaoka, K. Yoshimatsu und J. Arikawa. 2003. Use of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing hantaan or seoul virus envelope proteins in a rapid and safe neutralization test. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **10:**154-160.

Pilaski, J., C. Ellerich, T. Kreutzer, W. Benik, B. Lewandowski, A. Lang, I.B. Autenrieth und E. Vanek. 1991. Endemisches Vorkommen des Hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom (HFRS) in der Bundesrepublik Deutschland. Z. ärztl. Fortbild. (Jena) **85:**869-874.

Razanskiene, A., J. Schmidt, A. Geldmacher, A. Ritzi, M. Niedrig, Å. Lundkvist, D.H. Krüger, H. Meisel, K. Sasnauskas, und R. Ulrich. 2004. High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. **111:**319-333.

Robert Koch-Institut. 2002. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001; Berlin, S.61-63.

Robert Koch-Institut. 2003. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002; Berlin, S.65-68.

Robert Koch-Institut. 2004. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003; Berlin, S.73-77.

Robert Koch-Institut. 2005. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004; Berlin, S.79-83.

Robert Koch-Institut. 2006. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005; Berlin, S. 81-86.

Robert Koch-Institut: SurvStat, www3.rki.de, Datenstand: 31.01.2007.

Sasnauskas, K., O. Buzaite, F. Vogel, B. Jandrig, R. Razanskas, J. Staniulis, S. Scherneck, D.H. Krüger und R. Ulrich. 1999. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. Biol. Chem. **380:**381-386.

Schmidt, J., H. Meisel, B. Hjelle, D.H. Krüger und R. Ulrich. 2005a. Development and evaluation of serological assays for detection of human hantavirus infections caused by Sin Nombre virus. J. Clin. Virol. **33:**247-253.

Schmidt, J., B. Jandrig, B. Klempa, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, H. Meisel, M. Niedrig, C. Pitra, D.H. Krüger, und R. Ulrich. 2005b. Nucleocapsid protein of cell culture-adapted Seoul virus strain 80-39: Analysis of its encoding sequence, expression in yeast and immuno-reactivity. Virus Genes **30:**37-48.

Schmidt, J., H. Meisel, S.G. Capria, R. Petraityte, Å. Lundkvist, B. Hjelle, P.A. Vial, P. Padula, D.H. Krüger, und R. Ulrich. 2006. Serological assays for the detection of human Andes hantavirus infections based on its yeast-expressed nucleocapsid protein. Intervirology **49:**173-184.

Sjölander, K.B., F. Elgh, H. Kallio-Kokko, O. Vapalahti, M. Hägglund, V. Palmcrantz, P. Juto, A. Vaheri, B. Niklasson und Å. Lundkvist. 1997. Evaluation of serological methods for diagnosis of Puumala hantavirus infection (nephropathia epidemica). J. Clin. Microbiol. **35:**3264-3268.

Ulrich, R., B. Hjelle, C. Pitra und D.H. Krüger. 2002. Emerging viruses: The case "Hantavirus". Intervirology **45:**318-327.

Ulrich, R., H. Meisel, M. Schütt, J. Schmidt, A. Kunz, B. Klempa, M. Niedrig, P. Kimmig, G. Pauli, D.H. Krüger und J. Koch. 2004. Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz **47:**661-670.

Ulrich, R., S. Essbauer, J. Schmidt, M. Schütt, J. Koch, F.J. Conraths, H.-J. Pelz und M. Wenk. 2006a. Zunehmende Gefährdung durch von Nagetieren übertragene Hantaviren? AFZ – Der Wald 02/06, 90-94

Ulrich R., S. Essbauer M. Wenk, J. Schmidt, H.-J. Pelz, J. Jacob, W. Wegener, E.L. Madeja, U. Bender, K. Bradt, H. Quast, J. Koch, M. Groschup, F.J. Conraths, G. Dobler und T.C. Mettenleiter. 2006b. Zoonoseforschung: Hantaviren und Netzwerk "Nagetier-übertragene Pathogene". Pest Control News **33:**6-9.

Zöller, L., M. Faulde, H. Meisel, B. Ruh, P. Kimmig, U. Schelling, M. Zeier, P. Kulzer, C. Becker, M. Roggendorf, E.K.F. Bautz, D.H. Krüger.und G. Darai. 1995. Seroprevalence of hantavirus antibodies in Germany as determined by a new recombinant enzyme immunoassay. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **14:**305-313.

Zvirbliene, A., L Samonskyte, A. Gedvilaite, T. Voronkova, R. Ulrich und K Sasnauskas. 2006. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. J. Immunol. Methods **311:**57-70.

Institut für Bakterielle Infektionen und Zoonosen:

Rotz – Ein im Jahr 2006 nach Deutschland importierter Rotz-Fall zeigt, dass diese Erkrankung eine allgegenwärtige Gefahr ist

Elschner, M.*, Liebler-Tenorio, E., Wohlsein, P., Lange, E. und Kaden, V.

Eine mit dem Krankheitsbegriff „Rotz“ assoziierbare Erkrankung wurde schon in den Schriften des Hippokrates zwischen 450 und 425 v. Chr. und ein Jahrhundert später von Aristoteles beschrieben. Im Jahr 1882 gelang dem deutschen Militärarzt Loeffler die Entdeckung des Erregers (Loeffler, 1886). Die taxonomische Zuordnung des Rotzerregers hat sich immer wieder geändert. Das aktuelle Genus *Burkholderia* (*B.*) entstand durch die Herauslösung einiger Bakterienspezies aus der „*Pseudomonas*-Gruppe“. Weitere Bezeichnungen waren: *Bacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Pfeiferella, Malleomyces* und *Loefflerella* (Wittig et al., 2006).

Abb. 1: *B. mallei* Isolat „Zagreb“ auf Blutagar mit 3% Glycerin, 48 h inkubiert

Burkholderia mallei ist ein Gram-negatives, unbewegliches, 0,2 - 0,5 µm breites und 1,5 - 5 µm langes pleomorphes, Oxidase-positives Stäbchen mit abgerundeten Enden. Auf Kulturmedien sind die zum Zerfließen neigenden Kolonien von *B. mallei* weißlich bis cremefarben, dagegen ältere Kolonien gelb oder braun. Die Oberfläche ist feucht und glatt, die Konsistenz zähklebrig. Auf bluthaltigen Nährböden tritt keine Hämolyse auf (Abb. 1).

B. mallei ist in die Kategorie der Erreger der Risikoklasse 3 eingestuft und der Umgang mit diesem Keim ist deshalb nur in Sicherheitslaboren der Klasse 3 gestattet.

Bis Anfang des 20. Jahrhunderts war Rotz weltweit verbreitet. Insbesondere in Kriegszeiten trat die Krankheit bei Pferden gehäuft und vereinzelt auch bei Menschen auf. Dabei wurde die Verbreitung begünstigt durch schlechte Haltungsbedingungen und hohe Tierdichten. Durch strikte Test- und Keulungsprogramme wurde Rotz in Westeuropa und Nordamerika getilgt. Auch Australien gilt als frei. Endemische Herde existieren in der Türkei, im Irak und Iran, Pakistan, Indien, der Mongolei, China und Brasilien.

Für Infektionen sind besonders Esel und Maultiere empfänglich. Auch Kamele infizieren sich leicht, wenn sie mit rotzkranken Pferden zusammen gehalten werden. Bei kleinen Wiederkäuern treten natürliche Infektionen nur selten bei engem Kontakt zu erkrankten Equiden auf. Hunde und Hauskatzen sind für natürliche Infektionen nur wenig empfänglich, doch erkranken Feliden in Zoos (Löwen, Tiger, Leoparden) sehr leicht, wenn sie mit kontaminiertem Fleisch gefüttert werden. Rinder, Schweine und Vögel gelten als resistent.

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. Menschen infizieren sich durch den Kontakt mit rotzkranken Pferden, deren Sekreten oder Produkten (Fleisch), durch Schleimhautkontakt und über kleine Läsionen (Neubauer et al., 1997). Equiden erkranken akut, chronisch oder latent. Dies hängt von der Virulenz des Bakterienstammes, der Übertragungsart, der infektiösen Dosis und der individuellen Widerstandsfähigkeit ab. Schlechte Haltungsbedingungen und hohe Leistungsanforderungen begünstigen schwere Krankheitsverläufe.

Abb. 2: Herdförmige ulzerativer Dermatitis mit visköser, gelbgrauer Exsudation (Hautrotz)

Abb. 3: Zahlreiche, grau-gelblichen Knötchen mit rotem Saum, teilweise konfluierend zu irregulären Nasenschleimhautdefekten (Nasenrotz)

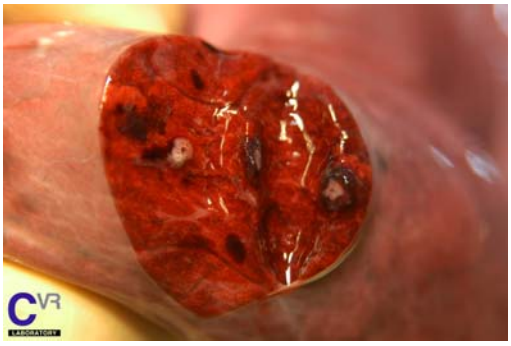


Abb. 4: Kleine graue, von einem hämorrhagischen Saum umgebene subpleurale, teilweise konfluierende Lungenknötchen von wenigen Millimetern Durchmesser (Lungenrotz)

Die Erkrankung kann in Form knotiger und geschwüriger Entzündungen in der Haut (Hautrotz), der Nasenschleimhaut (Nasenrotz) und der Lunge (Lungenrotz) auftreten (Abb. 2-4, mit freundlicher Genehmigung des Central Veterinary Research Laboratory, Dubai). Die Inkubationszeit kann je nach Verlaufsform zwischen drei Tagen und mehreren Monaten betragen. Bei Pferden dominiert die chronische oder latente Verlaufsform, die möglicherweise unerkannt bleibt und so durch ständige Erregerausscheidung zur weiteren Verbreitung der Infektion führt. Die Krankheitsdauer kann Monate bis Jahre betragen, wobei die Krankheitssymptome meist unspezifisch sind. Fieberschübe, ulzerierende Knötchen in der Nasenschleimhaut, Nasenbluten, einseitiger Nasenausfluss, Husten, Atembeschwerden und vergrößerte, schmerzlose Kopf- und Halslymphknoten treten auf. Typisch sind die bei der Abheilung der Rotzknötchen entstehenden „Eisblumen"-ähnlichen Narben. Der Tod kann durch Lungenblutung oder durch Entkräftung eintreten. Unter Stress ist ein Ausbruch der Erkrankung mit schnellem tödlichem Verlauf möglich. Latente Infektionen können auch spontan ausheilen.

Bereits der klinische Rotzverdacht ist in Deutschland anzeigepflichtig und muss unverzüglich dem zuständigen Veterinäramt gemeldet werden. Die Feststellung einer Infektion beim Pferd erfolgt in Deutschland nach den „Richtlinien zur Feststellung von Rotz (Malleus) bei Einhufern durch serologische und allergologische Untersuchungsverfahren" (Fassung von 1979). Es wird dabei zwischen der Feststellung von Rotz in Pferdebeständen und bei Handelstieren unterschieden. In Pferdebeständen werden Blutproben entnommen und mit der Komplementbindungsreaktion (KBR) und der Serumlangsamagglutination (SLA) auf Antikörper untersucht. Die Malleinaugenprobe (Konjunktivalprobe) kann zusätzlich zur Bestätigung einer Infektion herangezogen werden. Bei Handelstieren ist für die Erstuntersuchung nur die KBR erlaubt.

Die KBR wird bei infizierten Pferden innerhalb einer Woche nach der Infektion positiv (Whitwell und Hickmann, 1992). Aufgrund der hohen Sensitivität von 90% bis 95% ist sie die Methode der Wahl. Die Ergebnisse können jedoch durch eine Reihe von Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien (z.B. Pseudomonaden, Streptokokken) beeinträchtigt werden. Die Sensitivität und Spezifität der Methode wird jedoch kritisch hinterfragt, da in Laboratorien mit hohem Probenaufkommen immer wieder fragliche Ergebnisse erhoben werden. Das Fehlen kommerziell verfügbarer moderner Diagnostika und die fehlende Standardisierbarkeit von käuflichem KBR-Antigen erschweren zusätzlich die serologische Bestätigung einer vermuteten Infektion (Neubauer et al., 2005).

Die Anzucht des Erregers gestaltet sich schwierig, da bisher keine sensitiven Selektivnährböden beschrieben sind. *B. mallei*-Kolonien bilden sich auf Agar nur sehr langsam, so dass eine Bebrütung von mindestens 72h nötig ist. Dabei kann es zu Überwucherung der gesamten Agarplatte mit Begleitflora kommen und *B. mallei*-Kolonien werden übersehen oder die Reindarstellung ist unmöglich. Für die biochemische Identifizierung existieren bisher keine kommerziellen Testkits.

Bisher ist auch kein spezifischer Test auf der Basis von Antikörpern kommerziell erhältlich.

Eine Möglichkeit des Erregernachweises bzw. der Isolierung ist der diagnostische Tierversuch. Dafür werden männliche Meerschweinchen mit verdächtigen Proben infiziert, um die sogenannte Strauß-Reaktion (lokale Peritonitis und Orchitits) auszulösen. Allerdings hat diese Methode nur eine 20%ige Sensitivität und ist nicht sehr spezifisch. Als positives Ergebnis gilt nur die Manifestation von Rotz mit erfolgreicher Re-Isolierung des infektiösen Agens.

Eine schnelle und zuverlässige Identifizierung von *B. mallei* ist mit einem 5`-Nuclease Real-Time-PCR-Verfahren möglich (Tomaso et al., 2006). Ebenso wurde eine spezifische konventionelle PCR beschrieben (Scholz et al., 2006). Diese Methoden ermöglichen auch die sichere Unterscheidung von *B. mallei* und *B. pseudomallei*, das bei Pferden eine dem Rotz sehr ähnliche Erkrankung (sog. Pseudorotz) hervorrufen kann.

Therapieversuche an rotzkranken Pferden sind verboten. Erkrankte und latent infizierte Tiere müssen getötet und unschädlich beseitigt, alle Kontakttiere abgesondert und in bestimmten Abständen untersucht werden. Ein Impfstoff ist nicht verfügbar. Alle Versuche der Impfstoffentwicklung für Pferd und Mensch waren bisher erfolglos, da der Körper keine belastbare Immunität ausbildet.

Für den Menschen wird eine Antibiose nach dem aktuellen Stand der Infektionsmedizin entsprechend der Therapie der *B. pseudomallei*-Infektion (Melioidose) empfohlen. Derzeit gelten Tetracyclin oder eine Kombination aus Doxycyclin, Ceftazidim und Gentamicin als Mittel der Wahl. Die Prognose ist unbehandelt fatal und auch die Rezidivrate von Rotz dürfte beim Menschen trotz Behandlung ähnlich hoch sein wie die der Melioidose. Da Therapieerfahrungen und Impfstoffe nicht existieren, ist Rotz immer noch als gefährliche und lebensbedrohliche Zoonose zu betrachten.

Bei der Einfuhr von Equiden nach Deutschland gilt die Binnenmarkt-Tierseuchenschutz-Verordnung (BmTierSSchV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 10.8.1999 (BGBl. I S.1820) in der jeweils geltenden Fassung, zuletzt geändert durch Verordnung vom 30.04.2001 (BAnz S.8385). In dieser Verordnung wird u. a. die Einfuhr von Tieren und Waren nach gemeinschaftlich festgelegten Anforderungen geregelt. Beim Verbringen innerhalb der EU sind die Richtlinien 90/426/EWG und 90/425/EWG in der jeweils geltenden Fassung zu beachten. Im internationalen Verkehr mit Drittländern gelten die Einfuhrbestimmungen des jeweiligen Landes. Im „Manual of Standards For Diagnostic Tests and Vaccines“ sind die gültigen Testmethoden (KBR und Mallein-Test) für den internationalen Handel beschrieben (OIE, 2005).

Importierter Rotz-Fall 2006 – Eine kurze Fallbeschreibung

Im April 2006 wurde ein Hobbypferd der Rasse Criollo, weiblich, 8 Jahre alt, aus Brasilien über den Flughafen Frankfurt/M. importiert. Die Einfuhrpapiere bescheinigten ein bei Serumverdünnung 1:10 negatives Rotz-KBR-Ergebnis. Anfang Mai stellte der behandelnde Tierarzt Veränderungen an allen vier Beinen, eitrige, z. T. verkrustete Beläge am Nasenseptum, verschärfte Atemgeräusche, erhöhte Atemfrequenz und erhöhte Körpertemperatur fest. Eine eingeleitete bakteriologische Untersuchung ergab *E.coli,* Streptokokken und Klebsiellen. Das Tier wurde daraufhin antibiotisch behandelt.

Nach Äußerung des klinischen Rotzverdachtes durch den behandelnden Tierarzt wurde die erste Serumprobe im FLI auf Rotz-Antikörper zunächst mittels KBR untersucht. Nach einem positiven KBR-Ergebnis bei einer Serumverdünnung von 1:10 erfolgte eine Abklärungsuntersuchung mittels Westernblot, der ebenfalls ein positives Ergebnis erbrachte (Abb. 5). Auch die Untersuchung einer zweiten Probe verlief mit positivem Ergebnis. Auf der Basis dieser Untersuchungen erfolgte die Tötungsanordnung durch die zuständige Veterinärbehörde. Die zunächst festgestellten klinischen Symptome waren zu diesem

Zeitpunkt abgeklungen. Nach Aussagen der Besitzerin litt das Tier jedoch nach wie vor an Kurzatmigkeit und zeigte unter Belastung Atemprobleme.

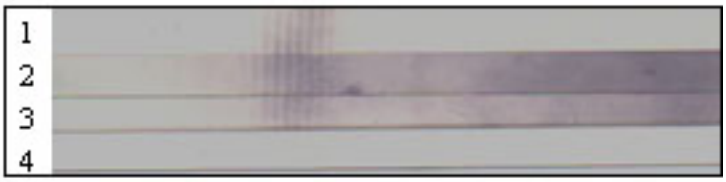


Abb. 5: Westernblot zum Nachweis von Anti-LPS-Antikörpern im Blutserum. 1 positive Kontrolle, 2,3 Verdachtsprobe, 4 Negative Kontrolle.

Das Tier wurde dem FLI übergeben und auf der Insel Riems im dortigen L3-Infektionsbereich aufgestallt. Hier erfolgten weitere Probenahmen und der Malleintest. Dieser ergab an der Injektionsstelle eine als positiv zu bewertende Hautdickenzunahme von 3,1 auf 8,2 mm, eine lokale Schmerzhaftigkeit und eine hochgradige perivaskulär akzentuierte pyogranulomatöse Dermatitis.

In Leber und Lunge waren zahlreiche Herdveränderungen zu finden. Bei der Mehrzahl handelte es sich um durch parasitäre Infestation verursachte eosinophile Granulome. Darüber hinaus wurden in der Leber vereinzelte Nekrosen ohne massive Infiltration von eosinophilen Granulozyten gefunden, die durchaus von *Burkholderia mallei* verursacht sein können. Weder mit Spezialfärbungen noch mit der Immunhistologie waren in diesen Bereichen Erreger bzw. *B. mallei* darstellbar.

Die Hautveränderungen an Vorder- und Hinterbeinen waren nicht charakteristisch für Rotz. Im gesamten oberen und unteren Respirationstrakt ergaben sich keine Hinweise für eine Rotzinfektion.

Bei immunhistologischen Untersuchungen der Veränderungen in Leber und Lunge des Pferdes konnten weder mit einem polyklonalen Antiserum noch monoklonalen Antikörpern gegen *B. mallei* Signale gesehen werden. Zahlreiche Proben wurden für Untersuchungen mittels PCR aufbereitet. Ausschließlich im Lungengewebe des Pferdes konnten Signale in der *B. mallei*-spezifischen *fliP*-Realtime-PCR nachgewiesen werden. Trotz umfangreicher Versuche zur Erregerisolierung konnte *B. mallei* nicht isoliert werden. Dies könnte durch die intensive Antibiotikabehandlung im Vorfeld des Rotzverdachtes bedingt sein.

Für den diagnostischen Tierversuch zur Erzeugung der sogenannten „Strauss"-Reaktion erfolgte die Infektion von fünf männlichen Meerschweinchen. Es traten ausgedehnte Unterhautphlegmonen an den Injektionsstellen auf, nicht jedoch die typischen, für eine Rotzinfektion sprechenden Orchitiden. Bei einem Meerschweinchen waren innerhalb des veränderten Gewebes im Injektionsbereich mit polyklonalem Antiserum und monoklonalen Antikörpern bei einer immunhistologischen Untersuchung spezifische Signale für *B. mallei* zu finden.

Zusammenfassung

Die Beobachtung Rotz-verdächtiger klinischer Symptome durch den behandelnden Tierarzt, der wiederholte Nachweis von Rotz-spezifischen Antikörpern mittels verschiedener Methoden, der positiv zu bewertende Mallein-Test, die Detektion von *B. mallei*-spezifischen Gensequenzen in der Lunge und der Nachweis von *B. mallei*-Antigen mittels monoklonalen und polyklonalen Antikörpern bei Meerschweinchen aus dem diagnostischen Tierversuch lassen auf das Vorliegen einer Rotz-Infektion schließen.

Dieser Fall zeigt, dass durch den globalen Handel mit Pferden jederzeit mit dem Einschleppen von Rotz gerechnet werden muss. Eine vordringliche Aufgabe ist die Verbesserung der serologischen Diagnostik, insbesondere um fragliche KBR-Ergebnisse abzuklären. Dafür wird am FLI an der Standardisierung und Validierung eines Westernblot-Verfahrens gearbeitet und die Eignung von rekombinanten Antigenen für die serologische Diagnostik geprüft.

Literatur

Loeffler, F. 1886. Die Ätiologie der Rotzkrankheit. Arb. Kaiserl. Gesundh. Amt. Berlin, 1:141-198.

Neubauer, H., E.-J. Finke und H. Mayer. 1997. Human glanders. International Review of the Armed Forces Medical Services, LXX, 10/11/12, 258-265.

Neubauer, H., L.D. Sprague, R. Zacharia, H. Tomaso, S. Al Dahouk, R. Wernery, U. Wernery und H.C. Scholz. 2005. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: State-of-the-art and perspectives. J. Vet. Med. B 52:201-205.

OIE. 2005. Manual of Standards For Diagnostic Tests and Vaccines, OIE, online-Version.

Scholz, H. C., M. Joseph, H. Tomaso, S. Al Dahouk, A. Witte, J. Kinne, R.M. Hagen, R. Wernery, U. Wernery und H. Neubauer. 2006. Detection of the re-emerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arabic Emirates by a newly developed *flip*-based PCR assay. Diag. Microbiol. Inf. Dis. 54:241-247.

Tomaso, H., H.C. Scholz, S. Al Dahouk, M. Eickhoff, T.M. Treu, R. Wernery, U. Wernery und H. Neubauer. 2006. Real-time identification of *Burkholderia pseudomallei* with a 5' nuclease real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. Clin. Chem. 52:307-310.

Wernery, U., J. Kinne und T. Morton. 2004. Pictoral guide to the diagnosis of equine glanders. CVRL Brochure 2004. Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, United Arabic Emirates.

Wittig, M.B., P. Wohlsein, R.M. Hagen, S. Al Dahouk, H. Tomaso, H.C. Scholz, K. Nikolaou, R. Wernery, U. Wernery, J. Kinne, M. Elschner und H. Neubauer. 2006. Ein Übersichtsreferat zur Rotzerkrankung. DTW 113:321-360.

Institut für Molekulare Pathogenese:

Organisiertes Schleimhaut-assoziiertes Lymphgewebe: Struktur und Funktion bei Rind, Schaf, Schwein und Pferd

Liebler-Tenorio, E.*

Einleitung

Das organisierte Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe (Mucosa-assoziiertes Lymphgewebe, MALT) stellt einen wichtigen Teil des Schleimhautimmunsystems dar. Für viele Infektionserreger ist es die Stelle, an der ein Initialkontakt mit dem Wirtsorganismus stattfindet und die als Eintrittspforte dient. Im Wirtsorganismus werden im MALT Immunantworten zum Schutz der Schleimhäute besonders effizient initiiert. Damit hat MALT eine ambivalente Funktion, die sich je nach Erregereigenschaften günstig oder ungünstig für den Wirt erweisen kann (18).

Nur Lymphgewebe mit den folgenden strukturellen und funktionellen Eigenschaften sollten als MALT bezeichnet werden (5):

- in engem Kontakt zur Schleimhautoberfläche gelegen
- organisiert, mit strukturierten Kompartimenten (Lymphfollikel, Interfollikularzone, u.a.)
- mit Lymphepithel, spezialisiert für die Antigenaufnahme
- keine afferenten Lymphgefäße

Davon zu unterscheiden sind fokale lymphatische Infiltrate der Schleimhaut, die bei verschiedensten Infektionen auftreten können (3, 12, 14).

MALT findet sich an den „Eintrittspforten", das heißt an den Schnittstellen zwischen Außenwelt und Wirt und ist strategisch so platziert, dass ein umfassendes Antigensammeln möglich ist. Man unterscheidet aufgrund der anatomischen Lokalisation Konjunktiva-assoziiertes Lymphgewebe (CALT), Tränengang-assoziiertes Lymphgewebe (LDALT), Nasopharynx-assoziiertes Lymphgewebe (NALT), Speicheldrüsen- und Ausführungsgang-assoziiertes Lymphgewebe (SALT/DALT), Larynx- u. Trachea-assoziiertes Lymphgewebe (LTALT), Lymphgewebe des Waldeyerschen Rachenrings (WR), Bronchus-assoziiertes Lymphgewebe (BALT), Magen-assoziiertes Lymphgewebe (gastric MALT) und Darm-assoziiertes Lymphgewebe (GALT) (Abb. 1). Bei Rind, Schaf, Schwein und Pferd ist MALT nicht an allen oben aufgeführten Lokalisationen beschrieben; dies bedeutet jedoch nicht, dass es dort nicht existiert.

Im folgenden soll der Stand des Wissens zu Struktur, Funktion und Relevanz der verschiedenen Anteile des MALT bei Infektionskrankheiten für die Tierarten Rind, Schaf, Schwein und Pferd im Überblick dargestellt werden.

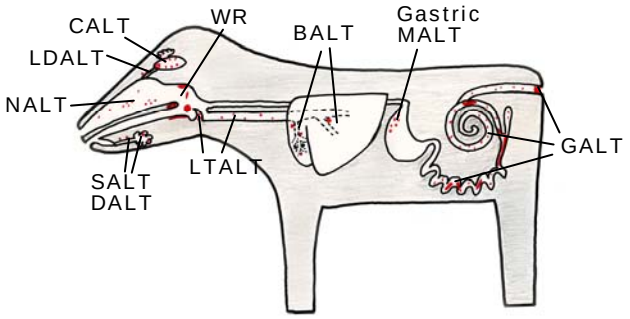


Abb. 1:
Schematische Darstellung der Verteilung von MALT (rot markiert) in den Schleimhäuten

CALT (Konjunktiva-assoziiertes Lymphgewebe)

Einzeln gelegene Lymphfollikel (ILFs) sind bei Rind, Schaf, und Schwein in der Konjunktiva beschrieben (8). Bei Schaflämmern konnte die Aufnahme von *Salmonella abortusovis* gezeigt werden (40). Damit könnte CALT für die Applikation von Vakzinen genutzt werden. Beim Schaf werden Biopsieproben aus der

Konjunktiva zur Gewinnung von peripherem lymphatischen Gewebe für den Nachweis von Scrapie genutzt (47).

NALT (Nasopharynx-assoziiertes Lymphgewebe)
Paarige Ansammlungen von MALT sind bei Labornagern auf dem Boden der Nasenhöhle beschrieben (20). Bei Rind, Schaf, Ziege, Schwein, Pferd sowie dem Menschen gibt es kein vergleichbares NALT. Beim Schaf und besonders beim Pferd konnten jedoch ILFs gehäuft in definierten Bereichen der Nase dargestellt werden (27, 46).

Lymphgewebe des Waldeyerschen Rachenrings (WR)
Im Gegensatz zu den Labornagern sind die Lymphgewebe des WR bei Rind, Schaf, Schwein und Pferd sowie beim Menschen sehr gut entwickelt. Große Ansammlungen von Lymphknötchen finden sich konstitutiv an definierten Lokalisationen als Tonsillen. Am oralen Zugang zum Pharynx liegen die Tonsilla (Tons.) lingualis, Tons. veli palatinae und Tons. palatina (Gaumenmandel, fehlt beim Schwein), am nasalen Zugang die Tons. pharyngea (Rachenmandel) und an der Öffnung des Gehörgangs die Tons. tubaria (26, 45). Sie sind bereits vor der Geburt vorhanden; die vollständige Differenzierung wird jedoch erst durch Antigenkontakt nach der Geburt induziert (28, 43). Die Menge des lymphatischen Gewebes im WR ist beim Pferd am größten gefolgt von Schwein, Rind und Schaf (45).
Die Tonsillen spielen beim Rind in der Pathogenese von Infektionen mit Erregern wie Bovinem Herpesvirus-1, BVD Virus, MKS Virus, *Mycobacterium bovis* und *Mannheimia haemolytica* eine Rolle (7, 10, 25, 44, 49, 52). Sie sind nicht nur für die Diagnose erkrankter Tiere von Bedeutung, sondern erlauben auch das Auffinden klinisch inapparenter Träger (33). Beim Schaf sind die Tonsillen Eintrittspforte für *Chlamydophila abortus* (ehemals: *Chlamydia psittaci)* und Reservoir für *Salmonella spp.* und *Mannheimia haemolytica* (2, 17, 19). Sie werden für die präklinische Testung von gesunden Schafen auf Scrapie herangezogen (42). Beim Schwein sind die Tonsillen Zielorgan für Erreger wie KSP Virus, PR Virus, MKS Virus, PRRS Virus und porcinem Circovirus-2, die dort besonders früh oder über einen längeren Zeitraum zu finden sind (1, 36, 37, 38, 48). Carrierstatus ist beschrieben für *Mycoplasma hyopneumoniae, Streptococcus suis, Salmonella spp.* und *Yersinia pseudotuberculosis* (15, 29, 39, 50). Tonsillen sind daher beim Schwein ein besonders wichtiges Gewebe für viele diagnostische Tests. Die Tonsillen des Pferdes können Reservoir für pathogene Erreger, wie *Streptococcus zooepidemicus*, darstellen. Ihre größte Bedeutung wird jedoch dem Schutz des oberen Respirationstrakts gegen Infektionen mit Influenzaviren und *Streptococcus spp.* (22) beigemessen und sie werden daher als interessantes Ziel für Impfstoffe angesehen (51).

LTALT (Larynx- u. Trachea-assoziiertes Lymphgewebe)
Bei Rind, Schaf, Schwein und Pferd sind ILFs im Bereich des Larynx und auf dem Kehldeckel zu finden (45). Bei Schaf und Schwein sind Teile davon zur Tons. paraepiglottica, beim Rind zur Tons. glottica organisiert (45). In der Trachea sind ILFs bisher nur beim Pferd beschrieben (27).

BALT (Bronchus-assoziiertes Lymphgewebe)
In der Lunge von Rind, Schaf, Schwein und Pferd sowie beim Menschen ist BALT weder konsititutiv noch an definierten Stellen zu finden (31). Dies scheint typisch zu sein für Spezies mit gut entwickeltem WR. Obwohl der Name „Bronchus"-assoziiertes Lymphgewebe verwendet wird, ist es in allen Abschnitten der luftführenden Wege an Abzweigungen, jedoch besonders häufig an Bronchiolen vorhanden, da inhalierte Partikel sich gerade dort in besonders großer Menge ansammeln können (3). Das Auftreten und die Entwicklung von BALT ist antigenabhängig und sehr dynamisch (27, 30). Bei keimfrei gehaltenen Schweinen ist kein BALT zu finden (21). Hyperplastisches BALT, das bei Rindern in Zusammenhang mit der enzootischen Pneumonie, bei Schaf und Ziege nach Infektionen mit *Mycoplasma spp.* und beim Schwein bei Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* (3, 35, 41) beobachtet wird, wird auch als „cuffing pneumonia" bezeichnet (Abb. 2). Es ist unklar, ob diese Hyperplasie als vorteilhafte Reaktion oder als Veränderung einzustufen ist. Infektionen des Respirationstraktes sind vor allem bei Rind und Schwein ein wirtschaftlich wichtiges, aber therapeutisch schwieriges Problem. Die Abwehr im Respirationstrakt korreliert am besten mit der lokalen Immunantwort. Daher könnten Kenntnisse zu Vorkommen und zur gezielten Induktion von BALT helfen, die lokale Immunantwort im Respirationstrakt zu optimieren.

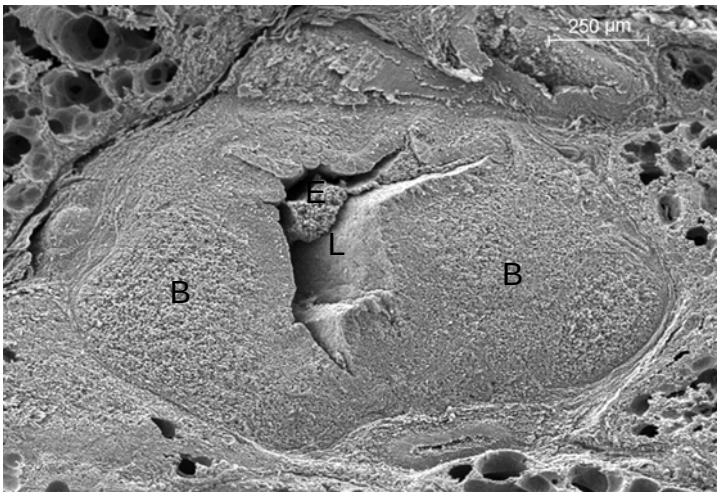


Abb. 2:
Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Lunge eines sieben Monate alten Kalbes mit persistierender/rezidivierender Chlamydien-Infektion. Das Lumen (L) eines Bronchiolus ist durch hyperplastisches BALT (B) und Exsudat (E) deutlich eingeengt.

gastric MALT (Magen-assoziiertes Lymphgewebe)
Im Magen findet man insbesondere beim Schwein ILFs (9). Sie werden durch Kolonisierung mit definierten Erregern, wie *Helicobacter pylori*, aktiviert (12). Dies ist von Interesse für vergleichende Untersuchungen der Helicobacterinfektion des Menschen.

GALT (Darm-assoziiertes Lymphgewebe)
GALT ist der Teil des MALT, der am intensivsten untersucht wurde und in der Literatur sehr ausführlich dokumentiert ist, da es eine wichtige Eintrittspforte für Antigene und Erreger darstellt (Übersicht in 26, Abb. 3 u. 4). GALT ist wie die Lymphgewebe des WR konstitutiv vorhanden, für seine postnatale Entwicklung ist Antigenstimulation jedoch wichtig (32). GALT findet man teils an definierten anatomischen Lokalisationen (ileale Peyersche Platte (IPP), Lymphgewebe am Ileocaecaleingang, Platten im Kolon), teils variabel (jejunale Peyersche Platten, ILFs) (6, 13, 23). Die IPP unterscheidet sich von den anderen Anteilen des GALT durch eine ausgeprägte Altersinvolution und ihre Zellzusammensetzung (16, 24, 34). Bei Schafen konnte eine antigenunabhängige Hypermutation in den Lymphfollikeln der IPP gezeigt werden und bei dieser Spezies wird sie als potentielles Bursaequivalent angesehen (13).

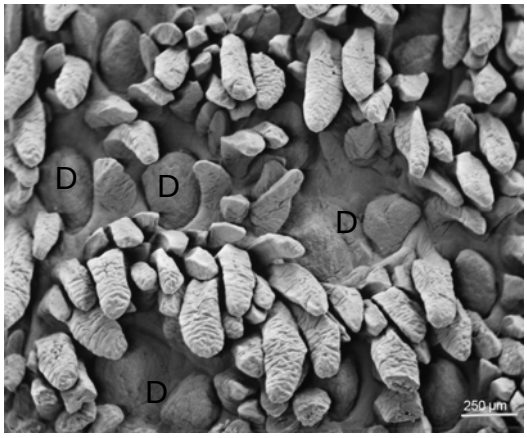


Abb. 3:
Rasterelektronenmikroskopische Darstellung einer Peyerschen Platte im Jejunum eines drei Wochen alten klinische gesunden Kalbes. Zwischen den Zotten sind einzelne Vorwölbungen von lymphatischem Gewebe (Domes, D) mit zur Antigenaufnahme spezialisiertem Epithel zu finden.

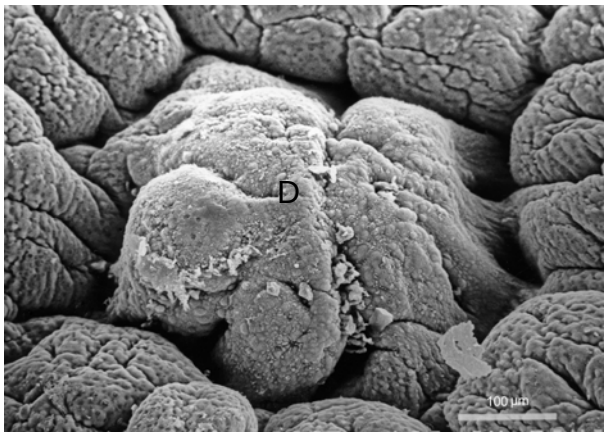


Abb. 4:
Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines Domes (D) mit zur Antigenaufnahme spezialisiertem Epithel in der Lymphknötchenplatte im Rektum eines drei Wochen alten klinisch gesunden Kalbes.

Über das Lymphepithel konnte die Aufnahme von Lösungen, Partikeln und verschiedensten Infektionserregern gezeigt werden (Übersicht in 11). Die Effizienz war jedoch sehr unterschiedlich zwischen den Lokalisationen, zwischen den Spezies und auch individuell. Dies mag an Unterschieden in der Frequenz der zur Aufnahme spezialisierten Zellen, aber auch an funktionellen Unterschieden in der Aufnahmekapazität dieser Zellen liegen.

Das Lymphepithel des GALT ist spezifisches Ziel für Erreger oder wird als Teil der Schleimhaut mitinfiziert. Mehrere Infektionen verursachen schwere Veränderungen im Bereich des GALT (4). Zusätzlich zu den Läsionen im GALT kommt es zur Beeinträchtigung der gesamten Darmbarriere, da weniger Plasmazellvorläufer und geprägte T-Lymphozyten produziert werden.

Zusammenfassung

Verteilung, Morphologie und Entwicklung von MALT unterscheiden sich bei Rind, Schaf, Schwein und Pferd. Dies beruht wahrscheinlich auf speziesspezifischen anatomischen und physiologischen Besonderheiten, da MALT immer strategisch als „Wachposten", bzw. für eine optimale Antigenaufnahme plaziert ist. Kenntnisse zum MALT bei Rind, Schaf, Schwein und Pferd sind aus folgenden Gründen wichtig:

- um es sicher aufzufinden, z.B. für diagnostische Tests.
- um Veränderungen dieser sehr dynamischen Gewebe von der Normalstruktur zu unterscheiden.
- um Erkenntnisse zur Pathogenese von Infektionen und zu Wirtsreaktionen zu gewinnen.
- um festzustellen, ob Induktionsstellen für die lokale Gabe von Vakzinen vorhanden oder induzierbar sind.

Darüber hinaus sollten vergleichenden Aspekte nicht vergessen werden. Für viele Erkrankungen des Menschen werden Labornager als Modelltiere eingesetzt, obwohl sie sich in Entwicklung, Lebensdauer, Umwelt, Ernährung, Physiologie und auch Struktur des MALT weit mehr vom Menschen unterscheiden als Rind, Schaf, Schwein oder Pferd.

Literatur

1. **Alexandersen, S., M.B. Oleksiewicz und A.I. Donaldson.** 2001. The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. J. Gen. Virol. **82**:747-755.

2. **Al-Sultan, I.I., und I.D. Aitken.** 1985, The tonsillar carriage of *Pasteurella haemolytica* in lambs. J. Comp. Pathol. **95**:193-201.

3. **Anderson, M.L., P.F. Moore, D.M Hyde und D.L. Dungworth.** 1986. Bronchus associated lymphoid tissue in the lungs of cattle: relationship to age. Res. Vet. Sci. **41**:211-220.

4. **Barker, I.K., und A.A. van Dreumel.** 1993. The alimentary sytem, in: Jubb K.V.F., P.C. Kennedy und N. Palmer (**Eds**.), Pathology of domestic animals, vol. 2, 4th ed., Academic Press, Orlando, pp. 149-158.

5. **Brandtzaeg, P., und R. Pabst**. 2004. Let's go mucosal: communication on slippery ground. Trends Immunol. **25**:570-577.

6. **Carlens, O.** 1928. Studien über das lymphatische Gewebe des Darmkanals bei einigen Haustieren mit besonderer Berücksichtigung der embryonalen Entwicklung, der Mengenverhältnisse und der Altersinvolution dieses Gewebes im Dünndarm des Rindes. Z. Anat. Entwicklungsgesch. **86**:393-493.

7. **Cassidy, J.P., D.G. Bryson und S.D. Neill.** 1999. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Vet. Rec. **144**:139-142.

8. **Chodosh J., R.E. Nordquist und R.C. Kennedy.** 1998. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune situ. Dev. Comp. Immunol. **22**:621-630.

9. **Driessen, A., C. Van Ginneken, J. Creemers, I. Lambrichts, A. Weyns, K. Geboes und N.Ectors.** 2002. Histological and immunohistochemical study of the lymphoid tissue in the normal stomach of the gnotobiotic pig. Virchows Arch. **441**:589-598.

10. **Frank, G.H., R.E. Briggs, B.M. DeBey und L. Lehane.** 1993. Bovine tonsils as reservoirs for *Pasteurella hemolytica*: colonization, immune response, and infection of the nasopharynx. In: Patten B.E., Spencer T.L., Johnson R.B., Hoffmann R. (Eds.), Australian Centre for international Agricultural Research Proceedings **43**, pp. 83-88.

11. **Gebert, A., HJ. Rothkotter und R. Pabst.** 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. Int. Rev. Cytol. **167**:91-159.

12. **Green, W.B., K. Eaton und S. Krakowka.** 1997. Porcine gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT): stimulation by colonization with the gastric bacterial pathogen, *Helicobacter pylori*. Vet. Immunol. Immunopathol. **56**:119-131.

13. **Griebel, P.J., und W.R. Hein.** 1996. Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. Immunol. Today **17**:30-39.

14. **Haeussler, M., E.M. Liebler, A. Daugschies und J.F. Pohlenz.** 1996. Changes n the number of lymphocyte subsets, macrophages, mast cells and eosinophils in the large intestine of pigs during infection with *Oesophagostomum dentatum*. Europ. J. Vet. Pathol. **2** Suppl.: 20-21.

15. **Hagedorn-Olsen T., N.C. Nielsen, N.F. Friis und J. Nielsen**. 1999. Progression of *Mycoplasma hyosynoviae* infection in three pig herds. Development of tonsillar carrier state, arthritis and antibodies in serum and synovial fluid in pigs from birth to slaughter. Zentralbl. Veterinarmed. A **46**:555-564.

16. **Hein, W.R., L. Dudler und C.R. Mackay.** 1989. Surface expression of differentiation antigens on lymphocytes in the ileal and jejunal Peyer's patches of lambs. Immunology **68**:365-370.

17. **Hjartardottir, S., E. Gunnarsson und J. Sigvaldadottir**. 2002. *Salmonella* in sheep in Iceland. Acta Vet. Scand. **43**:43-48.

18. **Horter, D.C., K.J. Yoon und J.J. Zimmerman**. 2003. A review of porcine tonsils in immunity and disease. Anim. Health Res. Rev. **4**:143-155.

19. **Jones, G.E., und I.E. Anderson**. 1988. *Chlamydia psittaci*: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion? Res. Vet. Sci. **44**:260-261.

20. **Kraal, G.** 2004. Nasal-associated lymphoid tissue. In: Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R., Mayer L. (Eds.), Mucosal immunology, vol.1, 3rd ed., Elsevier, Academic Press, Amsterdam, pp. 415-422.

21. **Kruml, J., J. Ludvik, I. Trebichavsky, L.Mandel und F. Kovaru**. 1969. Morphology of germ-free piglets. Folia Microbiol. **14**:441-446.

22. **Kumar, P., J.F.Timoney und A.S. Sheoran**. 2001. M cells and associated lymphoid tissue of the equine nasopharyngeal tonsil. Equine Vet. J. **33**:224-230.

23. **Landsverk, T., M. Halleraker, M. Aleksandersen, S. McClure, W. Hein und L. Nicander.** 1991. The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants; comparative aspects of structure, function and development. Vet. Immunol. Immunopathol. **28**:1-16.

24. **Lie, K.I., M.Aleksandersen und T. Landsverk**. 2005. Lymphoid follicles of different phenotype appear in ileum during involution of the sheep ileal Peyer's patch. Dev. Comp. Immunol. **29**:539-553.

25. **Liebler-Tenorio, E.M., J.F. Ridpath und J.D. Neill.** 2002. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhea virus type 2 in calves. Am. J. Vet. Res. **63**:1575-1584.

26. **Liebler-Tenorio, E.M. und R. Pabst.** 2006. MALT structure and function in farm animals. Vet. Res. **37**:257-280.

27. **Mair, T.S., E.H. Batten, C.R. Stokes und F.J. Bourne**. 1988. The distribution of mucosal lymphoid nodules in the equine respiratory tract. J. Comp. Pathol. **99**:159-168.

28. **Manesse, M., M. Delverdier, N. Abella-Bourges J., Sautet, P. Cabanie und F. Schelcher**. 1998. An immunohistochemical study of bovine palatine and pharyngeal tonsils at 21, 60 and 300 days of age. Anat. Histol. Embryol. **27**:179-185.

29. **Niskanen, T., M. Fredriksson-Ahomaa und H. Korkeala.** 2002. *Yersinia pseudotuberculosis* with limited genetic diversity is a common finding in tonsils of fattening pigs. J. Food Prot. **65**:540-545.

30. **Pabst, R.** 1996. The respiratory immune system of pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. **54**:191-195.

31. **Pabst, R., und I. Gehrke.** 1990. Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. **3**:131-135.

32. **Pabst, R., M. Geist, H.J. Rothkötter und F.J. Fritz**. 1988. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. Immunology **64**:539-544.

33. **Perez, S., M. Inman, A. Doster und C. Jones.** 2005. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. J. Clin. Microbiol. **43**:393-401.

34. **Reynolds, J.D., und B. Morris.** 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. Eur. J. Immunol. **13**:627-635.

35. **Rodriguez, F., A. Fernandez J., Oros, A.S. Ramirez, R. Luque H.J., Ball and J. Sarradell.** 2001. Changes in lymphocyte subsets in the bronchus-associated lymphoid tissue of goats naturally infected with different *Mycoplasma species*. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health **48**:259-266.

36. **Romero C.H., P.N. Meade, B.L. Homer, J.E. Shultz und G. Lollis.** 2003. Potential sites of virus latency associated with indigenous pseudorabies viruses in feral swine. J. Wildl. Dis. **39**:567-575.

37. **Rosell, C., J. Segales, J. Plana-Duran, M. Balasch, G.M. Rodriguez-Arrioja, S. Kennedy, G.M. Allan, F. McNeilly, K.S. Latimer und M. Domingo**. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. J. Comp. Pathol. **120**:59-78.

38. **Rowland, R.R., S. Lawson K., Rossow und D.A. Benfield**. 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. Vet. Microbiol. **96**:219-235.

39. **Salles, M.W.S., J. Perez-Casal, P. Willson und D.M. Middleton.** 2002. Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. Vet. Immunol. Immunopathol. **87**:51-63.

40. **Sanchis, R., G. Abadie und P. Pardon**. 1995. *Salmonella abortusovis* experimental infection induced by the conjunctival route: clinical, serological and bacteriological study of the dose effect in female lambs. Vet. Res. **26**:73-80.

41. **Sarradell, J., M. Andrada, A.S. Ramirez, A. Fernandez, J.C. Gomez-Villamandos, A. Jover, H. Lorenzo, P. Herraez und F. Rodriguez**. 2003. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Pathol. **40**:395-404.

42. **Schreuder, B.E., L.J. van Keulen, M.E. Vromans J.P., Langeveld und M.A. Smits**,. 1998. Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie, Vet. Rec. **142**:564-568.

43. **Schuh, J.C. und L.W. Oliphant**. 1992. Development and immunophenotyping of the pharyngeal tonsil (adenoid) in cattle. J. Comp. Pathol. **106**:229-241.

44. **Schuh, J.C., H. Bielefeldt Ohmann, L.A. Babiuk und C.E. Doige**. 1992. Bovine herpesvirus-1-induced pharyngeal tonsil lesions in neonatal and weanling calves. J. Comp. Pathol. **106**:243-253.

45. **Schummer, A., und R. Nickel**. 1978. Eingeweide. In: Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (Eds.), Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Vol. 2, 4th ed., Paul Parey, Berlin, Hamburg.

46. **Stanley, A.C., J.F. Huntley, M. Jeffrey und D. Buxton**. 2001. Characterization of ovine nasal-associated lymphoid tissue and identification of M cells in the overlying follicle-associated epithelium. J. Comp. Pathol. **125**:262-270.

47. **Thuring, C.M., L.J. van Keulen, J.P. Langeveld, M.E. Vromans, F.G. van Zijderveld, T. Sweeney**. 2005. Immunohistochemical distinction between preclinical bovine spongiform encephalopathy and scrapie infection in sheep. J. Comp. Pathol. **132**:59-69.

48. **Van Oirschot J.T.** 1992. Hog cholera. In: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'allaire S., Taylor D.J. (Eds.), Diseases of Swine, 7th ed., Iowa State University Press, Ames, USA.

49. **Winkler, M.T., A. Doster und C. Jones**. 1999. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. J. Virol. **73**:8657-8668.

50. **Wood, R.L., A. Pospischil und R. Rose.** 1989. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. Am. J. Vet. Res. **50**:1015-1021.

51. **Wu, H.Y., H.H. Nguyen und M.W. Russell**. 1997. Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site. Scand. J. Immunol. **46**:506-513.

52. **Zhang, Z., und S. Alexandersen**. 2004. Quantitative analysis of foot-and-mouth disease virus RNA loads in bovine tissues: implications for the site of viral persistence. J. Gen. Virol. **85**:2567-2575.

Institut für Immunologie:

CYSTUS052, ein Polyphenol-reiches Pflanzenextrakt, zeigt antivirale Aktivität gegen hochpathogene Influenzaviren

Dröbner, K., Oesterle, K., Wulle, U. und Planz, O.*

Einleitung

Die Virusgrippe – Influenza – ist immer noch eine der großen Seuchen in unserer Zeit. Insbesondere das Auftreten von neuen aviären Virusstämmen, die das Potential haben, direkt den Menschen zu infizieren, hat die Befürchtung für eine neue weltweite Influenza-Pandemie verstärkt. Die Influenza, eine Erkrankung der Atemwege, wird durch Influenzaviren verursacht. Diese Viren können hochpathogen für Mensch und Tier sein. Neben den jährlichen Ausbrüchen dieser Erkrankung sind Influenzaviren ferner in der Lage weltweite Pandemien auszulösen. Drei Influenza-Pandemien, die Spanische Grippe 1918, die asiatische Grippe 1957 und die Hongkong-Grippe 1968 gab es im letzten Jahrhundert (Wright und Webster, 2001; Palese, 2004), wobei die Spanische Grippe mit weltweit über 40 Millionen Todesopfern die verheerendste dieser Pandemien war (Reid et al., 2001; Taubenberger et al, 2001). Die statistische Wahrscheinlichkeit und das Auftreten neuer hochpathogener aviärer Influenzaviren (HAIV) der Subtypen H5 und H7, die bei Menschen zu einer tödlichen Infektion führen, zeigen die drohende Gefahr einer neuen Pandemie. Obwohl bereits über 250 Menschen mit H5N1 Viren infiziert wurden, konnte bisher eine effiziente Übertragung von H5N1 Viren von Mensch zu Mensch noch nicht beobachtet werden. Allerdings könnten die H5N1 Viren durch Mutationen oder durch Bildung von Reassortanten mit den momentan zirkulierenden humanen Influenzaviren diese Eigenschaft erlangen.

Die jährliche Grippeimpfung ist eine geeignete Strategie, die Virusgrippe zu kontrollieren und die Möglichkeit neuer Pandemien einzudämmen. Da Influenzaviren sich leicht verändern können, wird der Influenza-Impfstoff jährlich diesen Veränderungen angepasst, was eine jährliche Auffrischung des Impfschutzes notwendig macht. Neben der Impfung stehen antiviral wirkende Medikamente zur Verfügung, die die Ausbreitung des Virus kontrollieren können. Diese können insbesondere in der frühen Phase einer Pandemie nützlich sein, zu einem Zeitpunkt, zu dem Impfstoffe ggf. noch nicht zur Verfügung stehen (Ferguson et al., 2005; Longini et al., 2005). Zurzeit stehen zwei Klassen von anti-Influenzavirus-Medikamenten zur Verfügung. Hierbei handelt es sich zum einen um Inhibitoren der viralen Neuraminidase (Oseltamivir, Zanamivir) und zum anderen um Inhibitoren des viralen M2 Ionenkanals (Amantadine, Rimantadine) (Wright und Webster, 2001; DeClerq, 2004). Sehr oft treten Influenza A Viren auf, die gegen Amantadine und Rimantadine resistent sind (Cox and Subbarao, 1999; Susuki et al. 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits auch einige H5N1 Viren, die aus Patienten isoliert wurden, resistent gegen die Wirkung der M2 Ionenkanal-Inibitoren sind (Puthavathana et al., 2005). Zusätzlich gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass 20% der Influenza A Viren bei behandelten Kindern resistent gegen die Neuraminidase-Inhibitoren sind (Kiso et al., 2004) und es wurde auch bereits das Auftreten von solchen H5N1 Virusmutanten beschrieben (Le et al., 2005). Das Auftreten solcher neuen Virusisolate, die Resistenzen gegen beide Klassen von Medikamenten ausbilden können, zeigt die Notwendigkeit für neue Medikamente, die gegen diese Viren wirksam sind. Obwohl bereits verschiedene Substanzen entwickelt wurden, zeigten diese entweder Unverträglichkeiten in klinischen Studien oder es bildeten sich resistente Varianten (Nicholson et al., 2003).

Polyphenole repräsentieren eine Gruppe von sehr weit verbreiteten sekundären Pflanzenstoffen. Bisher sind über 8.000 verschiedene Phenol-Strukturen bekannt. Die Strukturen können von einfachen Molekülen wie z.B. Phenolsäuren bis hin zu komplexen Polyphenol-Strukturen variieren (Harborne, 1980). Polyphenole zeigen eine große Breite von biologischen Effekten. Sie können als Antioxidantien wirken oder sie unterstützen die biologische Aktivität von Vitamin C bzw. schützen vor vorzeitiger Hautalterung und binden Viren und Bakterien (Urquiaga and Leighton, 2000; Arts and Hollman, 2005; Halliwell et al., 2005). Die Bioverfügbarkeit der Polyphenole ist extrem unterschiedlich (Manach et al., 2005). Weiterhin ist das Wissen über Aufnahme, Verteilung und Verstoffwechselung von Polyphenolen inkomplett. Bisher ist bekannt, dass Polyphenole bioaktive Substanzen sind, die vom Darm aufgenommen werden, jedoch nur in wenigen Fällen metabolisiert werden können (Urquiaga and Leighton, 2000, Mannach et al., 2004). Aufgrund der relativ niedrigen Adsorption und niedriger Plasma-Konzentrationen wird angenommen, dass die Wirkungsweise insbesondere hoch-polymerer Polyphenole auf einen direkten physikalischen Effekt zurückzuführen ist (Halliwell, 2005).

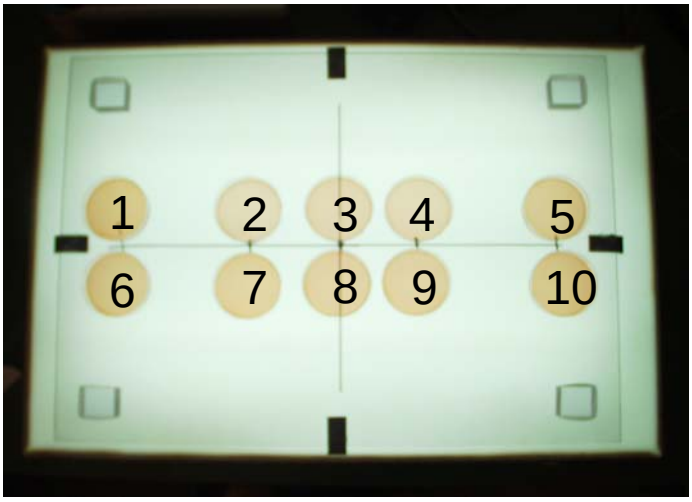
CYSTUS052 ist ein Pflanzenextrakt, das sehr reichhaltig an hoch-polymeren Polyphenolen ist. Der Extrakt ist eine spezielle Präpäration einer bestimmten Varietät von *Cistus incanus*. *Cistus incanus*, die graubehaarte Zistrose, ist ein Mitglied der Familie *Cistus L.* Die Familie der Zistrosen repräsentiert eine Gruppe von ca. 20 Pflanzen, die vom Mittelmeerraum bis in den Kaukasus beheimatet ist. Die Familie der Zistrosen besitzt einen hohen Grad an Anpassung an verschiedene Lebensräume und Naturereignisse (Comandini et al., 2006). Cistus-Pflanzen werden seit Jahrhunderten in der Naturmedizin gegen Durchfallerkrankungen, zur Behandlung verschiedener Hauterkrankungen und bei Entzündungsreaktionen eingesetzt (Petereit et al., 1991; Danne et al., 1993).

Die Adsorption hoch-polymerer Polyphenole im Körper und somit die systemische Verfügbarkeit dieser Stoffe ist sehr gering. Um zu untersuchen, ob Cistus gegen Influenzaviren wirkt, wurde eine lokale Vergabe in einer Aerosol-Formulierung gewählt. Zur Beantwortung der Frage, ob CYSTUS052-Extrakt überhaupt in einer Aerosol-Formulierung einen Effekt auf Influenzaviren besitzt, wurden Zellkulturexperimente durchgeführt, bei denen sowohl die Infektion als auch die Behandlung der Zellen als Aerosol stattfand. Für die Infektionsuntersuchungen wurden MDCK Zellen verwendet, die in 3,5 cm Petrischalen kultiviert wurden. Die Petrischalen wurden für die Infektionsexperimente auf definierte Positionen in der Aerosolkammer aufgestellt (Abb. 1A). Als Kontrolle für die Wirksamkeit der CYSTUS052-Extrakt Behandlung dienten MDCK Zellen, die mit PBS benebelt wurden. Eine Behandlung von MDCK Zellen zehn Minuten vor der Virusinfektion (10^5 pfu/ml) mit CYSTUS052-Extrakt (1mg/ml) führte zur Reduktion der Anzahl von Virusplaques in den Kulturzellen. Abhängig von der Position der Kulturschale in der Aerosolkammer konnte eine Reduktion der Anzahl der Virusplaques von bis zu 90% beobachtet werden (Abb.1B). Auch bei einer Erhöhung der Infektionsdosis auf 10^6 pfu/ml konnte bei den mit CYSTUS052-Extrakt behandelten Zellen eine Verminderung der Infektiosität von 70-90% im Vergleich zu Zellen, die mit PBS behandelt wurden, gefunden werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Um zu untersuchen, ob CYSTUS052-Extrakt auch in Mäusen einen Effekt gegen Influenzaviren besitzt, sollte vorab die Verträglichkeit des Extraktes getestet werden. Hierzu wurden fünf weibliche Balb/c Mäuse fünf Tage lang je 3mal täglich mit CYSTUS052-Extrakt (10mg/ml; 2ml; 1,5 bar) behandelt. Als Kontrollen dienten Wurfgeschwister, die keiner Behandlung unterzogen wurden. Somit konnte auch untersucht werden, ob die Aerosolbehandlung *per se* für Mäuse verträglich ist. Als Untersuchungsparameter wurde der generelle Gesundheitszustand der Tiere täglich beurteilt. Weiterhin wurden die Tiere täglich gewogen. Wie aus Abbildung 2A ersichtlich ist , zeigten die mit CYSTUS052-Extrakt behandelten Mäuse keine Veränderungen bezüglich ihres Gewichtsverlaufs während der gesamten Untersuchungsphase im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen. Auch der generelle Gesundheitszustand dieser Tiere war nicht verändert. Diese Ergebnisse zeigten somit, dass eine Behandlung von Mäusen mit CYSTUS052-Extrakt in einer Konzentration von 10mg/ml keine Nebenwirkungen induziert. Ferner zeigten diese Untersuchungen auch, dass generell eine aerosole Vergabe von CYSTUS052-Extrakt für Mäuse gut verträglich war. Somit war das Protokoll für die Behandlung von Influenzavirus-infizierten Mäusen geeignet.

Es ist bekannt, dass einige Polyphenole, unter anderem auch solche, die in CYSTUS052-Extrakt enthalten sind, anti-inflammatorisch wirken können. Um herauszufinden, ob eine lokale Behandlung der Lunge mit CYSTUS052-Extrakt einen Einfluss auf die systemische Immunantwort gegen Viren hat, wurde der klassische Fußrückenschwellungstest mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) durchgeführt (Moskophidis and Lehmann-Grube, 1989). Eine LCMV-Infektion in den Fußrücken von Mäusen führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion vom verzögerten Typ (DTH, delayed-type hypersensitivity). Hierbei handelt es sich um eine biphasische Reaktion unter der Beteiligung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, Cytokinen/Chemokinen sowie weiteren Entzündungszellen. Die Einwanderung dieser Zellen und der löslichen Faktoren in den Fußrücken führt zu einer messbaren Anschwellung des Fußes. Hemmung der Immunantwort oder Imunsuppresion führen zu einer reduzierten Fußrückenschwellung nach LCMV-Infektion. Für die Untersuchungen, ob CYSTUS052-Extrakt nach lokaler Applikation in die Lungen einen Einfluss auf die systemische Immunantwort hat, wurde LCMV vom Stamm WE verwendet. Die Infektionsdosis betrug 10^4 ffu/50 µl, die jeweils in den linken Fuß von C57Bl/6 Mäusen injiziert wurden. Der rechte Fuß der Mäuse diente als Kontrolle. Die Behandlung, die identisch wie in Abb. 2A beschrieben durchgeführt wurde, begann fünf Tage nach der Infektion. Zwischen Tag 6 und 10 nach der Infektion war ein deutlicher Anstieg der Fußrückenschwellung messbar, wobei kein Unterschied zwischen Mäusen, die mit CYSTUS052-Extrakt behandelt wurde, und Kontrollen,

die mit H_2O behandelt wurden, sichtbar war. Nach Tag 10 nahm die Schwellung wieder ab und 16 Tage nach der Infektion war sowohl bei den CYSTUS052-Extrakt behandelten Mäusen als auch bei den Kontrollen keine Schwellung mehr sichtbar (Fig. 2B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine lokale Aerosolbehandlung von CYSTUS052-Extrakt in die Lunge keinen Einfluss auf die systemische Immunantwort gegen LCMV besitzt.



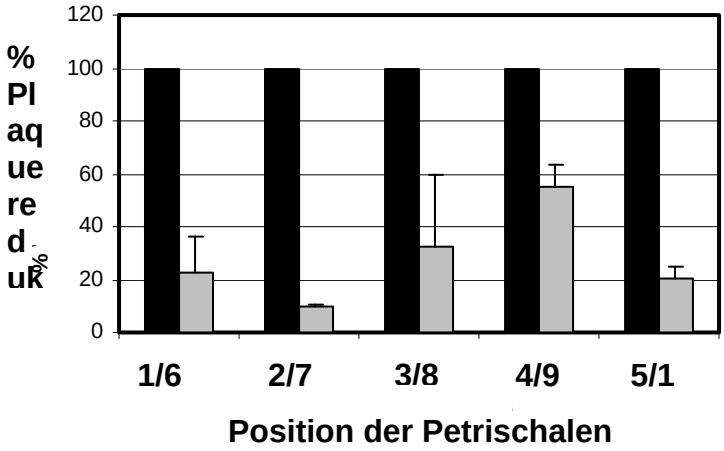


Abb. 1: Verminderung der Anzahl von Virusplaques nach Aerosolbehandlung von MDCK Zellen mit CYSTUS052-Extrakt. (A) Zehn 3,5 cm Petrischalen mit einem Monolayer MDCK Zellen wurden an verschiedene Stellen in einer Aerosolkammer positioniert. **(B)** Die Anzahl der Virusplaques in einer Kulturschale, die vor der Infektion mit PBS behandelt wurde (Kontrolle) wurde als 100% gesetzt (schwarze Balken). Die Reduktion der Anzahl von Virusplaques nach Behandlung mit CYSTUS052-Extrakt im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ist mit grauen Balken dargestellt. Für die Positionen 1 und 6, 2 und 7, 3 und 8, 4 und 9 sowie für 5 und 10 wurde der Mittelwert bestimmt. Die Grafik zeigt den Mittelwert von fünf unabhängigen Experimenten.

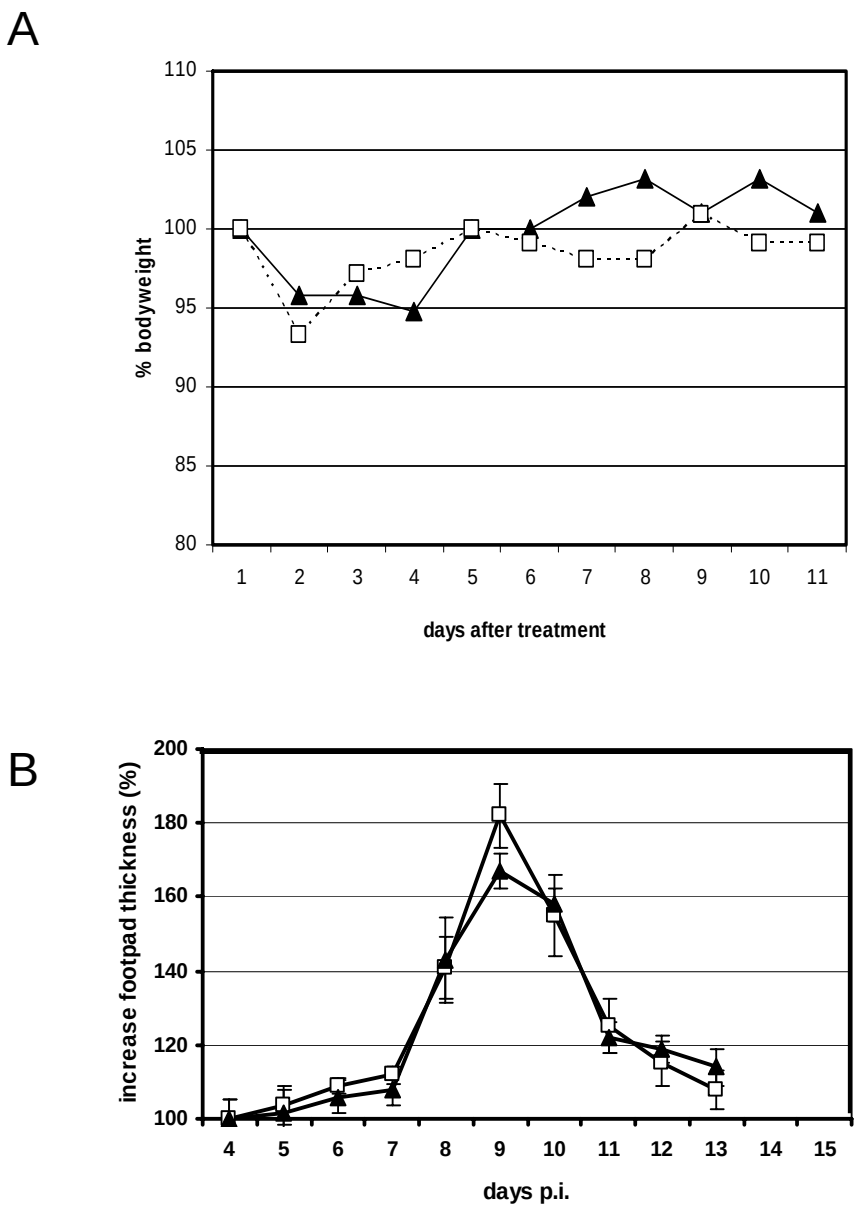


Abb. 2: Eine Behandlung von Mäusen mit CYSTUS052-Extrakt hat keine negativen Effekte auf den Gesundheitszustand. (A) Fünf weibliche Balb/c wurden 3-mal täglich für fünf Tage mit CYSTUS052-Extrakt (offene Quadrate) behandelt. Die Kontrollen wurden keiner Behandlung unterzogen (schwarze Dreiecke). Der Gesundheitszustand der Tiere wurde für elf Tage nach Beginn der Behandlung untersucht. Die Daten zeigen den Mittelwert des Körpergewichtes von fünf Mäusen (s.e.m. ≤ 5%). **(B)** Keine Unterschiede der LCMV-induzierten Fußrückenschwellung bei CYSTUS052-Extrakt behandelten Mäusen (schwarze Dreiecke) im Vergleich zu Mäusen, die mit H_2O, dem Lösungsmittel des CYSTUS052-Extraktes, behandelt wurden (offene Quadrate). Die Behandlung erfolgte wie in Abb. 1 beschreiben für fünf Tage. Die Grafikstellt den Mittelwert von fünf Mäusen dar (s.e.m. ≤ 5%). Die Infektion erfolgte 5 Tage vor Beginn der Behandlung mit LCMV-WE 10^4 ffu in den linken Fuß. Die Experimente wurden 2mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob CYSTUS052-Extrakt einen Effekt gegen Influenzaviren *in vivo* besitzt, wurden Balb/c Mäuse mit hochpathogenem aviärem Influenzavirus (Geflügelpestvirus, Fowl Plague Virus, FPV) infiziert. Die Behandlung mit CYSTUS052-Extrakt begann am Tag der Infektion, wie bereits oben beschrieben. Zur Analyse der Körpertemperatur und der körperlichen Aktivität der Mäuse nach Infektion wurden den Tieren Mini-Sender implantiert. Der Käfig war mit einem Empfänger verbunden, der Signale an einen Computer weiterleitete (Abb. 2C). Mit Hilfe dieser Technik konnten wir die Körpertemperatur sowie die Aktivität der Mäuse während der gesamten Versuchsdauer kontrollieren. Um sicherzustellen, dass der physiologische Stress durch die Beatmung für die Test- und die Kontrollgruppe vergleichbar waren, wurden Mäuse der Kontrollgruppe mit H_2O behandelt. Die Behandlung mit 2 ml CYSTUS052-Extrakt (10 mg/ml; 1.5 bar) bzw. H_2O erfolgte 3mal täglich um 9:00, 12:00 und 15:00 Uhr für fünf Tage. Direkt nach der ersten Behandlung wurden die Mäuse mit FPV 10^2 pfu/50 µl (LD_{50} = 10^2 pfu) infiziert. Bezüglich der Körpertemperatur und der körperlichen Aktivität zeigen Mäuse einen zirkadialen Rhythmus. Während des Tages ist eine Reduktion der Körpertemperatur und der Aktivität zu beobachten. Erst in den Abendstunden kommt es zum Anstieg der Körpertemperatur und der Aktivität. Wie zu erwarten, war kein Unterschied der Gruppen bezüglich der Körpertemperatur (Abb. 3A, links) und der Aktivität (Abb. 3B, links) vor Beginn der Behandlung und der Infektion zu beobachten. Während acht Tage nach der Infektion alle Mäuse der Kontrollgruppe klinische Symptome und eine Reduktion des Körpergewichts zeigten, waren bei keinen der mit CYSTUS052-Extrakt behandelten Mäusen krankheitsspezifische Symptome zu beobachten. Die mit CYSTUS052-Extrakt behandelten Mäuse zeigten auch acht Tage nach der Infektion einen zirkadianen Rhythmus bezüglich ihrer Körpertemperatur (Abb. 3A rechts) und der Aktivität (Abb. 3B rechts), während bei den Kontrollmäusen eine starke Störung dieser Rhythmen festzustellen war. Diese Beobachtungen korrelierten mit dem Verlauf des Körpergewichtes. Während der ersten fünf Tage nach Infektion war bei den Tieren beider Gruppen eine leichte Reduktion der Körpertemperatur festzustellen. Am sechsten Tag nach der Infektion zeigten die Tiere der Kontrollgruppe erste klinische Symptome und Veränderungen in der zirkadianen Rhythmik bezüglich Körpertemperatur und Aktivität. Weiterhin war ein starker Verlust des Körpergewichtes zu beobachten (Abb. 3C). Der Gewichtsverlust der Mäuse in der Kontrollgruppe nahm bis zum Tag 10 p.i. weiterhin zu. Danach kam es bei den Tieren dieser Gruppe zur Reduktion der klinischen Symptome und zur Gewichtszunahme. In dem hier dargestellten Experiment starben 60% (n=3) der Mäuse aus der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu entwickelten Mäuse, die mit CYSTUS052-Extrakt behandelt wurden keine klinischen Symptome, zeigten keinen signifikanten Gewichtsverlust und keine Veränderungen der zirkadianen Rhythmik. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Aerosol-Behandlung mit CYSTUS052-Extrakt zur Reduktion der Influenza A Virus Infektion in Mäusen führt.

Nachdem wir zeigen konnten, dass eine Behandlung von FPV-infizierten Mäusen mit CYSTUS052-Extrakt in einer Aerosolformulierung zur Verhinderung der Erkrankung führte, stellte sich im Folgenden die Frage, ob dieser Effekt auch bei einer oralen Applikation von CYSTUS052-Extrakt nach FPV Infektion in Mäusen zu erzielen war. Hierzu wurden Balb/c Mäusen 3mal täglich mit CYSTUS052-Extrakt für fünf Tage oral behandelt. Als Kontrolle dienten wiederum Mäuse, die mit H_20, dem Lösungsmittel von CYSTUS052-Extrakt, behandelt wurden. Bereits sechs Tage nach der Infektion zeigten sowohl Mäuse, die mit CYSTUS052-Extrakt behandelt wurden sowie Kontrollmäuse erste klinische Symptome und einen Verlust von Körpergewicht. Die klinische Symptomatik verstärkte sich bis Tag 8. Danach war eine Reduktion der klinischen Symptome zu beobachten (Abb. 4). Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine orale Applikation von CYSTUS052-Extrakt in Mäusen nach FPV Infektion keinen antiviralen Effekt zeigt.

Aufgrund der Tatsache, dass die biologische Verfügbarkeit von hoch-polymeren Polyphenolen sehr gering ist, wählten wir für die Behandlung der Mäuse eine Aerosol-Formulierung. Hierbei wurden wir durch unsere Zellkulturexperimente unterstützt, bei denen wir zeigen konnten, dass vernebeltes CYSTUS052-Extrakt die Infektion der Kulturzellen blockiert. Interessanterweise konnten wir diesen antiviralen Effekt im Zellkultursystem nur beobachten, wenn CYSTUS052-Extrakt vor der Infektion verabreicht wurde. Eine Vernebelung des Extraktes während oder nach der Infektion zeigte keine antiviralen Effekte.

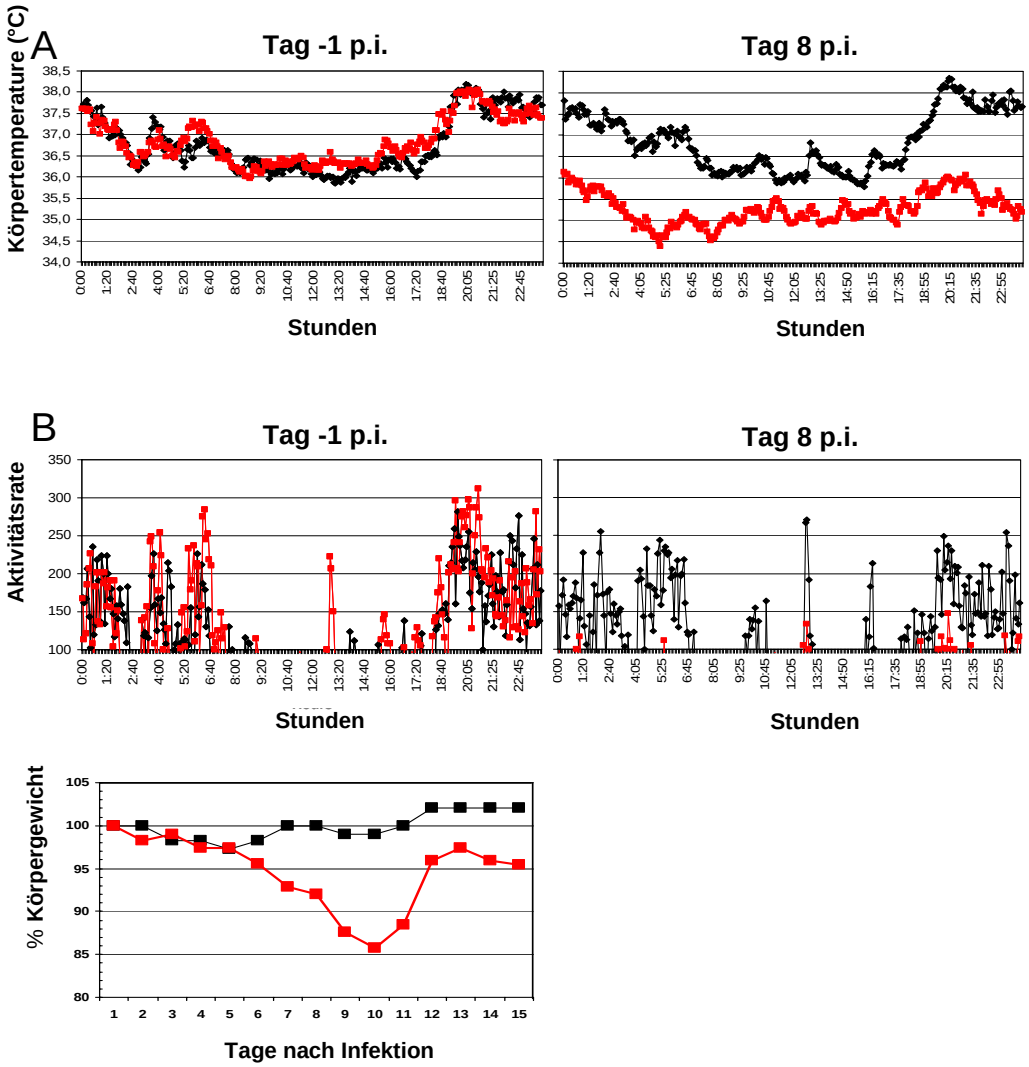


Abb. 3: Antiviraler Effekt von CYSTUS052-Extrakt in FPV-infizierten Mäusen. Fünf weibliche Balb/c Mäuse wurden entweder mit H_2O (rote Quadrate) oder mit CYSTUS052-Extrakt (schwarze Quadrate) 3mal täglich für fünf Tage behandelt. Direkt nach der ersten Behandlung wurden alle Mäuse mit 10^2 pfu/50 µl FPV infiziert. **(A, links)** Am Tag 1 vor der Infektion wurde kein Unterschied der Körpertemperatur beider Gruppen festgestellt. **(A, rechts)** Verlust der zirkadianen Rhythmik der Körpertemperatur bei Kontrollmäusen acht Tage nach Infektion. **(B, links)** Am Tag 1 vor der Infektion wurde kein Unterschied der körperlichen Aktivität beider Gruppen festgestellt. **(B, rechts)** Verlust der zirkadianen Rhythmik der körperlichen Aktivität bei Kontrollmäusen acht Tage nach Infektion **(C)** Reduktion des Körpergewichts bei Mäusen der Kontrollgruppe zwischen Tag 7 – 11 nach Infektion. CYSTUS052-Extrakt behandelte Mäuse zeigten keinen Gewichtsverlust, und keine klinischen Symptome, während die Mäuse der Kontrollgruppe starke Krankheitssymptome entwickelten und drei Mäuse dieser Gruppe zwischen Tag 7-10 starben. Nach Tag 10 war bei den Mäusen der Kontrollgruppe ein Anstieg der Körpertemperatur festzustellen. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt, mit der Ausnahme, dass in einem Experiment zwei CYSTUS052-Extrakt behandelte Mäuse klinische Symptome entwickelten und starben.

Somit stellt sich die Frage, welcher molekulare Mechanismus für die antivirale Eigenschaft von CYSTUS052-Extrakt gegen Influenzaviren verantwortlich ist. Aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse und durch frühere *in vitro* Untersuchungen denken wir, dass die hoch-polymeren Polyphenole im

CYSTUS052-Extrakt die Influenzaviren binden und somit die Infektion der Wirtszelle physikalisch blockieren. Diese Hypothese wird durch unsere *In-vitro*-Untersuchungen unterstützt. Hier konnten wir zeigen, dass eine Behandlung von Zellen während oder nach der Infektion keinen Effekt auf die Virusausbreitung hatte. Diese Ergebnisse werden auch durch Arbeiten von Ludwig und Mitarbeitern unterstützt, die zeigen konnten, dass CYSTUS052-Extrakt direkt das virale Oberflächenprotein Hämagglutinin bindet (Ehrhardt et al., 2007; Manuskript eingereicht).

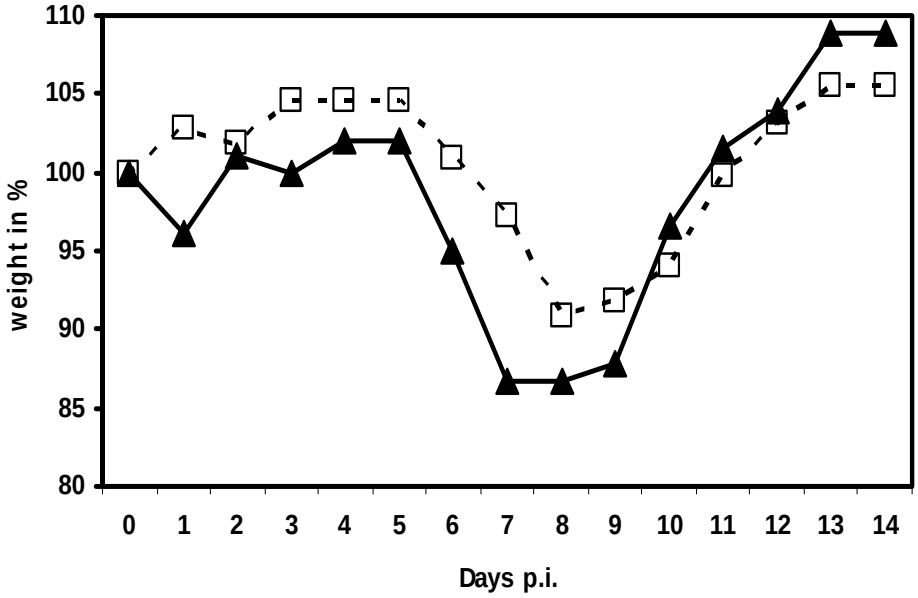


Abb. 4: Kein antiviraler Effekt gegen Influenza A Virus Infektion nach oraler Applikation von CYSTUS052-Extrakt in Mäusen. Fünf weibliche Balb/c Mäuse wurden entweder mit CYSTUS-Extrakt (weiße Quadrate) oder mit H_2O (schwarze Dreiecke) behandelt. Die Beobachtung des Gesundheitszustands sowie die Messung des Körpergewichtes wurden bis Tag 11 nach der Infektion durchgeführt. Die Grafik repräsentiert den Mittelwert von fünf Mäusen (s.e.m. ≤ 5%).

Zusammen unterstützen diese Ergebnisse unsere Hypothese einer physikalischen Blockade der Bindung des Virus an die Wirtszelle und sprechen gegen einen intrazellulären Mechanismus. Das ist im Einklang mit der Tatsache, dass nur wenige hochpolymere Polyphenole metabolisiert werden (Urquiaga and Leighton, 2000; Mannach et al., 2004; Halliwell, 2005).
Dennoch gibt es einige, hauptsächlich niedermolekulare Polyphenole, die biologisch aktiv sind, vom Darm resorbiert werden können und entweder in einer nativen oder modifizierten Form eine antivirale Aktivität gegen Influenzaviren zeigen. Eine dieser biologisch aktiven Substanzen ist Resveratrol, ein Polyphenol, das von verschiedenen Pflanzen synthetisiert wird. Resveratrol ist unter anderem im Rotwein zu finden, da es von Trauben synthetisiert wird (Fremont 2000). Es ist bekannt, dass Resveratrol verschiedene intrazelluläre Signalwege beeinflusst und eine antivirale Aktivität gegen Influenza A Viren *in vitro* und *in vivo* besitzt (Palamara et al 2005). Die Tatsache, dass eine orale Vergabe von CYSTUS052-Extrakt keinen Effekt gegen Influenzaviren hatte, spricht gegen einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie bei Resveratrol und unterstützt erneut die Hypothese der direkten physikalischen Blockade der Virus-Wirtszellinteraktion.
Aufgrund der Tatsche, dass die Pflanze *Cistus incanus* sehr reichhaltig an Polyphenolen ist, konnten wir unsere Untersuchungen direkt mit dem Extrakt der Pflanze durchführen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass nur der Extrakt der Varietät CYSTUS052 eine antivirale Aktivität besitzt. Extrakte von anderen Varietäten zeigten diese Wirkung nicht (Ehrhardt et al., 2007, Manuskript eingereicht). Ein großer Vorteil der Verwendung von gesamtem Pflanzenextrakt ist die Tatsache, dass das Risiko von toxischen Nebenwirkungen reduziert werden kann. In der Tat konnten wir zeigen, dass CYSTUS052-Extrakt in einer Aerosol-Formulierung in einer Konzentration von 10mg/ml keine Nebenwirkungen bei Mäusen verursachte. Auch zeigten unsere Experimente mit LCMV, dass die lokale Vergabe von CYSTUS052-Extrakt in die Lunge keinen negativen Einfluss auf eine systemische Virusinfektion hatte. Diese

Ergebnisse werden durch die Tatsache unterstützt, das Extrakte der Zistrose schon seit mehreren hundert Jahren im südeuropäischen Raum als traditionelles Heilmittel eingesetzt wurden.

Literatur

Arts, I. und P. Hollman. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. Am. J. Clin. Nutr. **81:**317-325.

Comandini, O., M. Comtu und A.C. Rinaldi. 2006. An overview of Cistus ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza **16:**381-395.

Cox, N.J. und K. Subbarao. 1999. Influenza. Lancet **354:**1277-1282.

Danne, A., F. Petereit und A. Nahrstedt. 1993. Proanthocyanidins from Cistus incanus. Phytochemistry **14:**1129-1133.

De Clercq, E. 2004. Antiviral drugs in current clinical use. J. Clin. Virol. **30:**115-133.

Ferguson, N.M., D.A. Cummings, S. Cauchemez, C. Fraser, S. Riley, A. Meeyai, S. Iamsirithaworn und D.S. Burke. 2005. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. Nature **437:**209-214.

Fremont, L. 2000. Biological effects of resveratol. Life Sci. **66:**663-673.

Halliwell, B., J. Rafter und A. Jenner. 2005. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? Am. J. Clin. Nutr. **81:**268-276.

Harborne, J. B. 1980. Plant phenolics, in: Bell, E.A., Charlwood, B.V. (eds.). Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 8 Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 329-395.

Kiso, M., K. Mitamura, Y. Sakai-Tagawa, K. Shiraishi, C. Kawakami, K.F. Kimura, G. Hayden, N. Sugaya und Y. Kawaoka. 2004. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet **364:**759-765.

Le, Q.M., M. Kiso, K. Someya, Y.T. Sakai, T.H. Nguyen, K.H. Nguyen, N.D. Pham, H.H. Ngyen, S. Yamada, Y. Muramoto, T. Horimoto, A. Takada, H. Goto, T. Suzuki, Y. Suzuki und Y. Kawaoka. 2005. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. Nature **437:**1108.

Longini, I.M. Jr., A. Nizam, S. Xu, K. Ungchusak, W. Hanshaoworakul, D.A. Cummings und M.E. Halloran. 2005. Containing pandemic influenza at the source. Science **309:**1083-1087.

Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy und L. Jimenez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. **79:**727-747.

Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert und C. Rémésy. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am. J. Clin. Nutr. **81:**230-242.

McCullers, J.A. 2006. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. Clin. Microbiol. Rev. **19:**571-582.

Moskophidis, D. und F. Lehmann-Grube. 1989. Virus-induced delayed-type hypersensitivity reaction is sequentially mediated by $CD8^+$ and $CD4^+$ T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86:**3291-3295.

Nicholson, K.G., J.M. Wood und M. Zambon. 2003. Influenza. Lancet **362:**1733-1745.

Palamara, A.T., L. Nencioni, K. Aquilano, G. De Chiara, L. Hernandez, F. Cozzolino, M.R. Ciriolo und E. Garaci. 2005. Inhibition of influenza A virus replication by resveratol. J. Infect. Dis. **191:**1719-1729.

Palese, F. 2004. Influenza: old and new threats. Nat. Med. **10:**82-87.

Petereit, F., H. Kolodziej und H. Nahrstedt. 1991. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from Cistus incanus. Phytochemistry **30:**981-985.

Puthavathana, P., P. Auewarakul, P.C. Charoenying, K. Sangsiriwut, P. Pooruk, K. Boonnak, R. Khanyok, P. Thawachsupa, R. Kijphati und P. Sawanpanyalert. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. J. Gen. Virol. **86:**423-433.

Reid, A.H., J.K. Taubenberger und T.G. Fanning. 2001. The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology. Microbes Infect. **3:**81-87.

Suzuki, H., R. Saito, H. Masuda, H. Oshitani, M. Sato und I. Sato. 2003. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. J. Infect. Chemother. **9:**195-200.

Taubenberger, J.K., A.H. Reid, T.A. Janczewski und T.G. Fanning. 2001. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **356:**1829-1839.

Urquiaga, I. und F. Leighton. 2000. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. Biol. Res. **33:**55-64.

Wright, P.F. und R.G. Webster. 2001. Orthomyxoviruses, in: Knipe D.M., Howley, P.M. (eds.) Fields virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. S. 1533-1579.

IV. LAUFENDE FORSCHUNGSPROJEKTE

1. VIREN

1.1 BORNAVIREN

1.1.1 Virus der Bornaschen Krankheit (Borna Disease Virus, BDV)

Das Virus der Bornaschen Krankheit (Borna disease virus, BDV) ist ein nicht-zytolytisches neurotropes RNA Virus, das natürlicherweise bei Pferd, Schaf und gelegentlich beim Rind eine nicht eitrige Enzephalomyelitis verursacht. Experimentell ist das BDV auf eine Vielzahl von Tierspezies vom Vogel bis zu Primaten übertragbar. Im Modellsystem der Ratte, aber auch bei natürlich infizierten Pferden konnte als pathogenetisches Prinzip eine T-Zell-vermittelte Immunpathologie gefunden werden, wobei $CD8^+$ T-Zellen als Effektoren und $CD4^+$ T-Zellen als klassische Helfer fungieren. Ein wesentliches Merkmal der Infektion mit BDV ist die Neigung zur Viruspersistenz, wobei insbesondere die Bedeutung einer neonatalen Infektion bei immunologischer Toleranz für eine mögliche Virusverbreitung noch unklar ist.

Persistent tolerante Borna Disease Virus Infektion zur Untersuchung degenerativer Gehirnveränderungen
Stitz, L.*, Gagulić, E., Rufer, E., Rziha, H.-J. und Planz, O.
(in Zusammenarbeit mit Bilzer, T. [Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf])

Das als nicht-zytopathogener Erreger eingestufte BDV verursacht eine nicht-eitrige Enzephalomyelitis mit schweren degenerativen Hirnveränderungen in Folge einer immunpathologischen Reaktion auf T-Zellbasis. Eine direkte Beteiligung des Virus an den pathologischen Veränderungen konnte bisher nicht untersucht werden, weil ein geeignetes experimentelles Modell fehlte. In Annäherung an eine Infektion ohne immunpathologische Reaktion wurde bisher die persistent tolerante Infektion neugeborener Ratten nach intrazerebraler Virusinjektion als geeignetes Modell untersucht. Die pathomorphologischen Konsequenzen durch die direkte mechanische Schädigung des Gehirngewebes konnten hierbei jedoch bisher nicht abgeschätzt werden. Neugeborene Ratten wurden durch eine nicht-invasive, aerogene Virusapplikation innerhalb der ersten 24 Lebensstunden infiziert und damit gleichzeitig immuntolerant gegenüber BDV. Die persistent tolerante Infektion wurde durch Nachweis virusspezifischer Nukleinsäure im Blut der Tiere bestätigt, eine immunpathologische Reaktion blieb jedoch aus, was die erfolgte Tolerisierung auf T-Zellebene beweist. Eine Antikörpersynthese wurde bei manchen Tieren nachgewiesen, bei anderen Tieren hingegen konnten keine Virus-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Dies entspricht früheren Befunden, dass eine Toleranz auf B-Zellebene entstehen kann, aber nicht zwingend erfolgt. Die Gehirne dieser persistent tolerant infizierten Tiere wiesen makroskopisch auch nach Infektionszeiten von über einem Jahr keine Veränderungen auf. Mikroskopische, insbesondere immunhistologische Methoden zeigten jedoch distinkte pathologische Veränderungen und Störungen von Neurotransmittern sowie anderen Syntheseleistungen von Gehirnzellen, die näher analysiert werden.

1.2 BUNYAVIREN

1.2.1 Hantaviren

Entwicklung, Validierung und Optimierung serologischer Untersuchungsmethoden zum Nachweis von humanen Hantavirus-Infektionen
Ulrich, R.G.* und Mertens, M.
(In Zusammenarbeit mit Essbauer, S.S., Pfeffer, M., Wölfel, R., Dobler, G. [Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München], Quast, H. [Schledehausen], Emmerich, P. [Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg], Petraityte, R., Zvirbliene, A., Sasnauskas, K. [Institute of Biotechnology, Vilnius])

In Deutschland sind durch serologische und molekularbiologische Untersuchungen bisher mindestens drei verschiedene Hantavirus-Arten nachgewiesen worden: Das Puumalavirus (PUUV) rief die Mehrzahl der humanen Hantavirus-Infektionen in Deutschland hervor und verursachte in den Jahren 2004/2005

Ausbrüche in verschiedenen Gebieten Deutschlands. Eine zweite, bisher ausschließlich in Nord- und Nordostdeutschland nachgewiesene Hantavirus-Art ist das Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV). Ein drittes, wahrscheinlich deutschlandweit verbreitetes Hantavirus ist das Tulavirus (TULV), über dessen Humanpathogenität bisher nur wenig bekannt ist.
Da für eine hochsensitive serologische Diagnostik die jeweils homologen Antigene notwendig sind, wurden die Nukleokapsid-Proteine von TULV und dem PUUV-Stamm PUUV-Bawa, der für den Hantavirus-Ausbruch in Niederbayern 2004 verantwortlich war, in Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Die amino-terminale Fusion eines Hexahistidin-Motifs erlaubte die Reinigung der rekombinanten Proteine mittels Nickelchelatchromatographie. Die vergleichende Charakterisierung dieser und weiterer Hantavirus-Nukleokapsidproteine anderer Hantaviren zeigte unterschiedliche Reaktivitätsmuster. Auf der Basis rekombinanter Nukleokapsidproteine von PUUV und DOBV und ausgewählter Humanseren wurden initiale Standardprotokolle für die Durchführung indirekter Enzymimmunoassays und Westernblots erarbeitet. Gegenwärtig werden diese Testsysteme unter Verwendung definierter Humanserum-Panels validiert. Durch vergleichende ELISA-Untersuchungen soll die Reaktivität von Nukleokapsidproteinen von zwei verschiedenen PUUV-Stämmen und TULV verglichen werden. Für die weitergehende Validierung der Testsysteme wurde ein Serumpanel in einem Hantavirus-Ausbruchsgebiet gesammelt.

1.3 CALICIVIREN

In der Familie *Caliciviridae* wird eine Reihe von nicht umhüllten Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom positiver Polarität zusammengefasst. Humanmedizinisch relevant sind Erreger, die für die Auslösung von Gastroenteritiden beim Menschen verantwortlich sind und die Genera *Norovirus* und *Sapovirus* bilden. Weiterhin gehören wichtige tierpathogene Viren wie das Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV), welches Erkrankungen mit hoher Mortalität bei Kaninchen der Spezies *Oryctolagus cuniculus* mit prominenter Leberpathologie und hämorrhagischem Syndrom verursacht und gemeinsam mit dem European hare syndrome virus (EBHSV) die Gattung *Lagovirus* bildet, sowie das zu respiratorischen aber auch systemischen Erkrankungen bei der Katze führende FCV (Gattung *Vesivirus*) zur Virusfamilie.

1.3.1 Virus der Hämorrhagischen Kaninchenkrankheit (RHDV) und Felines Calicivirus (FCV)

Analysen zur Genomorganisation und Strategie der Genexpression
Luttermann, C. und Meyers, G.*

Die Calicivirus-RNA enthält zwei bzw. drei offene Leserahmen (ORF), wobei der ORF1 die Gene für die viralen Replikationsenzyme umfasst und in ein hypothetisches Polyprotein translatiert wird, das proteolytisch in die reifen Virusproteine zerlegt wird. Das Hauptkapsidprotein VP1 wird im 3'-terminalen Drittel des ORF1 oder im ORF2 kodiert. Nahe am 3'-Ende des Genoms befindet sich ein ORF, der für das minore Kapsidprotein VP2 kodiert. Die Expression der beiden Kapsidproteine erfolgt hauptsächlich über eine prominente subgenomische RNA, die beim RHDV ca. 2,4 kb lang ist und die Gene für VP1 und VP2 enthält. Der Mechanismus, der für die Translation des VP2 verantwortlich ist, wird seit einiger Zeit am Beispiel des RHDV und des FCV im Detail untersucht. Beide Viren nutzen einen bisher nicht beschriebenen Translationsterminations-/Reinitiationsmechanismus für die Expression des VP2. Das Besondere daran ist, dass eine der Stop-/Start-Region vorgelagerte Sequenz für die Expression essentiell ist. Dieses von uns als ‚termination upstream ribosomal binding site' (TURBS) bezeichnete Sequenzelement umfasst beim FCV ca. 70, beim RHDV ca. 90 Nukleotide – inklusive der Stop-/Start-Region. Innerhalb der TURBS wurden durch Arbeiten mit Deletionskonstrukten zwei Sequenzmotive identifiziert, die für die Reinitiation der Translation essentiell sind. Eines dieser Motive ist bei Caliciviren konserviert und zu einer Sequenz der ribosomalen 18S-RNA komplementär. Die derzeitige Hypothese geht davon aus, dass diese Sequenz für die Bindung von Postterminations-Ribosomen sorgt und diese analog zu einer prokaryontischen Shine-Dalgarno-Sequenz für den Neustart der Translation positioniert. Dies würde auch erklären, warum die Initiation weitgehend unabhängig von einem klassischen Initiationscodon, aber unter Verwendung einer Initiator-tRNA erfolgt. In weiteren Untersuchungen soll versucht werden, diese Hypothese zu verifizieren und zu vertiefen.

Simultane Expression des Kapsidproteins von RHDV und RHDVa in einem Baculovirus – die erste bivalente rekombinante RHD-Vakzine
Gall, A., Granzow, H. und Schirrmeier, H.*

Impfprogramme zur Bekämpfung der RHD sind auf Grund zunehmender Bedenken gegenüber der Technologie der Vakzineproduktion (Herstellung aus Leberhomogenaten von Kaninchen, die experimentell mit RHDV infiziert wurden) sowie der Existenz neuer, genetisch und antigen abweichender RHDV-Stämme neu zu bewerten. Insbesondere der seit etwa zehn Jahren auftretende Subtyp RHDVa, der in zahlreichen europäischen Ländern im Begriff ist, das klassische RHDV zu ersetzen, verdeutlicht den Handlungsbedarf zur Entwicklung von Vakzinen mit einem breiteren Spektrum.
Mit Hilfe des Bac-to-Bac®-Baculovirus-Expression-Systems wurde ein rekombinantes Baculovirus konstruiert, das das Kapsidprotein (VP60) beider RHDV-Subtypen auf hohem Niveau exprimiert. Durch eine spezielle Klonierungsstrategie können beide Proteine separat mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden. Das exprimierte VP60 setzt sich zu „virus like particles", die strukturell und antigenetisch mit RHDV identisch sind, zusammen und hämagglutiniert humane Erythrozyten. Eine experimentelle Subunitvakzine, die aus dem neuartigen rekombinanten Baculovirus hergestellt wurde, hatte nach intramuskulärer Verabreichung an Kaninchen eine fast 20mal höhere Immunität als ein kommerzieller, auf Leberhomogenaten basierender Impfstoff zur Folge. Bei einer Belastungsinfektion wurde ein Schutz gegen beide Subtypen des RHDV festgestellt. Im Gegensatz dazu war die Kreuzprotektion gegenüber RHDVa bei Kaninchen, die die kommerzielle Vakzine erhielten, weniger gut ausgeprägt.

1.4 FLAVIVIREN

1.4.1 Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV)

Das Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) gehört zur Familie *Flaviviridae* und bildet gemeinsam mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhöe (BVDV) der Typen I und II sowie dem Border Disease Virus (BDV) der Schafe das Genus *Pestivirus*, welches auch atypische Pestiviren beinhaltet. Beim KSPV handelt es sich um ein kleines, behülltes Virus mit einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität. Es ist hoch kontagiös und führt nach Infektion von Haus- und Wildschweinen zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten. Das Genom ist etwa 12,5 kb lang und umfasst einen großen offenen Leserahmen, der für 3.898 Aminosäuren kodiert. Neben dem Nukleokapsidprotein C (p14) bilden die drei glykosylierten Hüllproteine E^{rns}, E1 und E2 die Strukturproteine. Infizierte Tiere bilden Antikörper gegen E^{rns}, E2 und das Nichtstrukturprotein NS 2-3. Das Strukturprotein E2 stellt das Hauptimmunogen dar. Es ist daher auch wichtig für den Schutz nach Vakzination.

***Intra-vitam*-Nachweis von KSP mittels RT *real-time* PCR**
Depner, K.R.*, Hoffmann, B. und Beer, M.

Die von Hoffmann et al. (2005) beschriebene RT *real-time* PCR zum *Intra-vitam*-Nachweis von KSP-Virusgenom wurde im Routineverfahren evaluiert. Der PCR-Test wurde mit der zellkulturellen Virusisolierung und dem Antigennachweis mittels ELISA verglichen. Das Untersuchungsmaterial (Blutproben) stammte aus einem Tierversuch, in dem KSPV-infizierte Schweine unterschiedliche Krankheitsverläufe gezeigt haben. Mittels PCR konnten alle infizierten Schweine unabhängig vom Krankheitsverlauf erkannt werden. Die Sensitivität der PCR lag über der der zellkulturellen Virusisolierung und des ELISA. Die infizierten Schweine wurden schon während der Inkubationsphase, in der klinischen Phase und sogar zu Beginn der Rekonvaleszenz, zu einem Zeitpunkt, zu dem schon Antikörper nachweisbar waren, als positiv erkannt. In den meisten Fällen reagierte der PCR-Test zwei Tage vor der Virusisolierung positiv und zwei bis vier Tage vor dem ELISA.

RT *real-time* PCR zum Nachweis von KSP bei Wildschweinen
Depner, K.R.*, Strebelow, G., Hoffmann, B. und Beer, M.

Es wurden 1.026 Organproben (Milzhomogenisate) von Wildschweinen aus einem KSP-Geschehen in Nordrhein-Westfalen mit der von Hoffmann et al. (2005) beschriebenen RT *real-time* PCR untersucht. In

Voruntersuchungen konnte aus 26 Proben KSP-Virus im Zellkultursystem isoliert werden, aus 1.000 Proben wurde kein Virus isoliert. Zusätzlich zu den 26 viruspositiven Proben wurden mittels PCR weitere zehn Proben als positiv ermittelt. In einem vergleichend durchgeführten Antigen-ELISA reagierten nur vierzehn Proben positiv. Für den ELISA konnte somit eine Sensitivität von 39%, für die zellkulturelle Virusisolierung von 72% und für die PCR von 100% errechnet werden. Sequenzanalysen der PCR-positiven Proben bestätigten, dass es sich nicht um falsch-positive Ergebnisse gehandelt hat. Die RT *real-time* PCR wird als Routinetest zum KSP-Nachweis bei Wildschweinen empfohlen.

Molekulare Typisierung rumänischer KSPV-Isolate

Strebelow, G. und Depner, K.R.*

Während der vergangenen zehn Jahre trat die Klassische Schweinepest in vielen europäischen Ländern auf (Deutschland, Belgien, Italien, Spanien, Österreich, Tschechien, Großbritannien, Slowakei, Kroatien, Bulgarien, Niederlande, Frankreich). In Rumänien ist die Klassische Schweinepest endemisch. 2005 wurden über 1.500 Ausbrüche in 33 der 42 Bezirke festgestellt. Die Mehrzahl der Ausbrüche waren Einzelereignisse. Über die Ausbreitung und Übertragung der Krankheit zwischen den einzelnen Schweinehaltungen oder von einer Region zur anderen existieren keine gesicherten epidemiologischen Daten. Die Genotypen der zirkulierenden KSPV sind unbekannt. Ziel unserer Arbeit war die molekulare Typisierung der KSPV-Isolate, die in Rumänien in den letzten Jahren zirkulierten. Dazu wurden 72 Proben der Jahre 2004, 2005 und 2006 aus allen betroffenen Bezirken sequenziert. Die Auswahl der untersuchten Viren erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Dabei waren alle betroffenen Provinzen eingeschlossen. Für die Genotypisierung wurden die Sequenzen der nicht translatierten (UTR) 5'-Region und der E2-Region ermittelt. Die RT-PCR-Amplifikate wurden direkt sequenziert. Die phylogenetische Analyse erfolgte mittels der Datenbank des Nationalen Referenzlabors Klassische Schweinepest. Der Vergleich der Sequenzen des UTR5'-Fragments mit den Sequenzen der Datenbank ergab, dass 62 Isolate zu 100 % identisch waren mit einer Gruppe von Isolaten der letzten Jahre aus verschiedenen europäischen Ländern. Diese Gruppe wurde durch das EU-Referenzlabor als „*2.3 Europe*" bezeichnet. Zehn Isolate zeigten Unterschiede von 1 oder 2 Basen. Diese Isolate sind eng verwandt mit Isolaten aus Tschechien, Ungarn, Polen, Italien und mit deutschen Isolaten der Subgruppen 2.3 Uelzen und 2.3 Spreda. Die Analyse der E2-Fragmente erbrachte entsprechende Ergebnisse.

Wissenschaftliche Begleitung der oralen Immunisierung der Wildschweine gegen KSP in der Praxis

Kaden, V.* und Lange, E.

(in Zusammenarbeit mit Blicke, J., Straubinger, B. und Jonas, D. [Rheinland-Pfalz]; Jäger, F. und Blankenhorn, A. [Nordrhein-Westfalen]; Lange, B. [Riemser Arzneimittel AG])

Nach der erfolgreichen Bekämpfung der KSP beim Schwarzwild in nahezu allen Impfgebieten Deutschlands wurde im Oktober 2005 auf Grund des erneuten Aufflammens der KSP im Bad Münstereifeler Wald (Nordrhein-Westfalen) ein neues Impfgebiet eingerichtet, wobei auch das angrenzende Gebiet in Rheinland-Pfalz in die Impfmaßnahmen einbezogen wurde. Die für die Tierseuchenbekämpfung zuständigen Behörden wurden bei der Bekämpfung der KSP des Schwarzwildes beraten und unterstützt, u.a. auch indem eine Analyse des Geschehens und eine Ableitung von Maßnahmen zur effektiveren Bekämpfung der KSP in diesem Gebiet Nordrhein-Westfalens vorgenommen wurde. Ferner erfolgte eine fachliche Einweisung der Jäger in die Details des Impfverfahrens und dessen Problemfelder.

Zur Wirksamkeit von lyophilisierter C-Stamm-Vakzine nach oraler Immunisierung von Wild- und Hausschweinen

Brauer, A., Lange, E. und Kaden, V.*

Auf der Grundlage neu entwickelter runder Köder von 3 cm Durchmesser und Hartgelatinekapseln als Impfstoffbehältnis wurde die Wirksamkeit von lyophilisierter C-Stamm-Vakzine untersucht. In Experiment 1 wurden drei Vakzinationsgruppen gebildet: Gruppe 1 – gegenwärtige Ködervakzine, Gruppe 2 – Köder mit 1 ID Lyphilisat, Gruppe 3 – Köder mit 2 ID Lyophilisat. Experiment 2 bestand aus zwei Gruppen: Gruppe 1 – gegenwärtige Ködervakzine, Gruppe 2 – Köder mit 2 ID Lyophilisat. Die Infektion erfolgte mit hochvirulentem KSPV „Alfort 187" und geringer Challengedosis, wobei im zweiten Experiment eine höhere Challengedosis verwendet wurde.

Die Ergebnisse zeigten, dass die lyophilisierte Vakzine in etwa gleich hohe neutralisierende Antikörpertiter induzierte wie die gegenwärtig verwendete flüssige Oralvakzine. Alle Tiere, die den Köder komplett aufgenommen hatten, blieben nach Infektion klinisch gesund und zeigten weder Virämie noch Virusausscheidung. Auch war zu Versuchsende kein Challengevirus bzw. virale RNA in den Organen feststellbar, so dass sich lyophilisierter C-Stamm als effektive Vakzineformulierung für die orale Immunisierung erwies.

Empfehlungen für ein diagnostisches Monitoring in einer Schwarzwildpopulation nach Beendigung der Immunisierungsmaßnahmen gegen KSP auf der Grundlage diagnostischer Daten

Kaden, V.*, Kramer, M., Teuffert, J. und Staubach, C.
(in Zusammenarbeit mit Kern, B. [Landesamt für Verbraucherschutz und Flurneuordnung Brandenburg]; Hlinak, A. [Landeslabor Brandenburg]; Mewes, L. [Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt]; Hänel, A. [Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart]; Renner, Ch. [Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg]; Dedek, J. [Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fische Mecklenburg-Vorpommern]; Bruer, W. [Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Nordvorpommern])

Die diagnostisch-epidemiologische Analyse der KSP bei Wildschweinen in Deutschland zeigt, dass zur Erkennung der Seuche die virologische Untersuchung des Fallwildes, des krank angesprochenen Wildes sowie der in Verkehrsunfälle involvierten Wildschweine sehr wichtig ist. Zusätzlich sind vor allem Frischlinge im Alter von ≤ 6 Monaten in die virologische Überwachung einzubeziehen, um eine hohe Sicherheit im virologischen Monitoring zu haben. Welche Kategorien an Wildschweinen in das serologische Monitoring nach Beendigung der Impfmaßnahmen zu involvieren sind, hängt von folgenden Faktoren ab: Alter der Tiere, Jahreszeit der letzten Impfung und dem vergangenen Zeitintervall seit der letzten Impfung. Davon ausgehend wurden für die ersten drei Jahre nach Einstellen der Impfung verschiedene Szenarien für serologische Untersuchungen der einzelnen Altersklassen vorgeschlagen.

Vergleich der Wirksamkeit unterschiedlicher KSP-Markervakzinekandidaten nach parenteraler Impfung

Kaden, V., Faust, A., Lange, E., Durban, M., Strebelow, G., Reimann, I. und Beer, M.*
(in Zusammenarbeit mit Wehrle, F., Renzullo, S. und Hofmann, M. [Institut für Virologie und Immunprophylaxe, Mittelhäusern, Schweiz])

Drei auf einem cDNA-Klon des attenuierten C-Stammes (Riems) basierende Markervakzinekandidaten (vRiems-ABC-Gif, vRiems-TAV1-Gif, vRiems-5'TAV-Gif) und zwei auf einem chimären Bovinen Virusdiarrhöe-Virus basierende Viren (CP_7E2alf, CP7_E1E2alf) wurden in ihrer Wirksamkeit im Vergleich zum konventionellen C-Stamm untersucht. Die Vakzinen wurden intramuskulär appliziert.
Die Schweine aller Versuchsgruppen entwickelten neutralisierende Antikörper innerhalb von vier Wochen post vaccinationem (p.v.) mit Ausnahme der Tiere der Gruppe vRiems-ABC-Gif, in der der mittlere neutralisierende Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Infektion (28 dpv) 6±4 ND_{50} betrug. Die höchsten Antikörpertiter wurden in der Gruppe CP7_E1E2alf festgestellt, gefolgt von den mit C-Virus bzw. CP7_E2alf geimpften Tieren. Alle vakzinierten Schweine blieben, unabhängig von der Höhe der Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Infektion, post infectionem (p.i.) klinisch gesund. Alle Schweine hatten p.i. weder eine Virämie noch wurde Virus oder virale RNA im Nasensekret ausgeschieden. Die überlebenden Tiere waren zum Ende der Studie ebenfalls virologisch negativ, was die hohe Wirksamkeit der Vakzinekandidaten bei parenteraler Anwendung zeigt.
Keines der mit einem der Markervakzinekandidaten vakzinierten Schweine reagierte p.v. im Antikörper-ELISA CSFV E^{rns} positiv, aus der C-Virusgruppe war p.v. eines der fünf vakzinierten Tiere in dem Test serologisch positiv. Nach der Infektion hatten alle mit den vom attenuierten C-Stamm abgeleiteten Chimären vakzinierten Schweine Antikörper gegen E^{rns}. Fünf der zehn mit den CP7_-Chimären geimpften und infizierten Schweine wurden mit dem E^{rns}-Antikörper-ELISA als infiziert identifiziert.

Untersuchungen zur Bedeutung der Enzephalitis bei experimentell mit KSPV infizierten Haus- und Wildschweinen

Klopfleisch, R.*, Teifke, J.P., Lange, E. und Kaden, V.

Aus vorangehenden Tierversuchen wurden 20 Haus- und elf Wildschweine, die mit unterschiedlichen Klassischen Schweinepestvirus-Isolaten (Uelzen, Koslov) inokuliert worden und an KSP erkrankt waren,

histopathologisch auf das Vorkommen und Verteilungsmuster entzündlicher Läsionen im zentralen Nervensystem untersucht. Klinisch waren bei keinem der Tiere zentralnervöse Symptome vorhanden, obwohl bekannt ist, dass KSP regelmäßig mit einer Meningoenzephalitis einhergeht.
Die histopathologische Untersuchung von vier Gehirnlokalisationen (Bulbus olfactorius, zerebraler Kortex, Thalamus, Zerebellum mit Medulla oblongata) ergab eine geringgradige lympho-plasmozytäre, vorwiegend perivaskuläre Meningoenzephalitis bei sechs der Hausschweine, die nur im Hirnstamm und in der weißen Substanz des Kleinhirns lokalisiert war. Bei keinem der Wildschweine konnten Läsionen im ZNS beobachtet werden. Der diagnostische Wert der KSP-Enzephalitis ist aufgrund dieser Untersuchungen zumindest bei experimentell infizierten Tieren entgegen der Literaturmeinung als alleiniges Kriterium vorsichtig zu beurteilen.

Epidemiologische Ausbruchsuntersuchungen zur Schweinepest bei Haus- und Wildschweinen
Teuffert, J.*, Unger, F., Staubach, C. und Kramer, M.

Hausschweine
Nachdem in Deutschland am 19. Februar 2003 der vorerst letzte Schweinepestausbruch bei Hausschweinen im Landkreis Bad Dürkheim (Rheinland-Pfalz) auftrat, kam es am 3. März 2006 in zwei Mastbeständen des Landkreises Recklinghausen (Nordrhein-Westfalen) zum Wiederauftreten dieser Tierseuche in der Hausschweinpopulation. In deren Folge ereigneten sich in Nordrhein-Westfalen zeitversetzt bis zum 9. Mai 2006 weitere sechs Ausbrüche, davon jeweils drei in den Landkreisen Recklinghausen und Borken. Seit Beginn dieses Seuchenzuges unterstützte das FLI die zuständigen Behörden bei den Untersuchungen zum Auftreten und zur Verbreitung der Tierseuche und erstellte für jeden Seuchenbetrieb den epidemiologischen Bericht. Hilfeleistungen wurden weiterhin erbracht, indem die Teilsequenzierung der Virusisolate sowie weitere labordiagnostische Abklärungsuntersuchungen durchgeführt wurden.
Obwohl der Erregereintrag in den Indexbestand nicht beweisend ermittelt werden konnte, gab es Hinweise für den vermuteten Einschleppungsweg aus der Wildschweinpopulation. Für die Weiterverbreitung in dem betroffenen Gebiet kommen vordergründig Personenverkehr und Nachbarschaftskontakte in Betracht. Sieben der acht Seuchenbestände betrieben Schweinemast, nur ein Bestand Schweinezucht. In den von Schweinepest betroffenen Betrieben wurden etwa 8.000 Schweine getötet. Aufgrund der Festlegung, alle Schweine in den Betrieben des Sperrbezirkes sowie in den Kontaktbeständen zu töten, erhöhte sich die Anzahl der insgesamt in diesem Seuchengeschehen getöteten Schweine auf ca. 130.000.

Wildschweine
Im Jahr 2006 wurde in Deutschland bei insgesamt 44 Wildschweinen die Schweinepest festgestellt. Diese Fälle traten in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen (42) und Rheinland-Pfalz (2) in zuvor mit der Riemser Schweinepest-Oralvakzine beimpften Gebieten auf. Kennzeichnend für das Seuchengebiet 2005/2006 war, dass es im Ursprungsgebiet von Nordrhein-Westfalen lag, in dem vom 22. April bis 14. Oktober 2002 erstmals Schweinepestfälle bei Wildschweinen auftraten. Als dort aufgrund von Bekämpfungsmaßnahmen unter Einschluss der oralen Immunisierung (OIS) vorerst keine weiteren Seuchenfälle mehr festgestellt wurden, kam es im September 2004 zur Aufhebung der Sperrmaßnahmen in diesem Gebiet. Zuvor wurde die Beimpfung nach der Frühjahrsauslage 2004 eingestellt.
Bereits im Oktober 2005 kam es zum Wiederauftreten der Schweinepest in dieser Region, woraufhin wie zuvor Sperrmaßnahmen sowie Bekämpfungsmaßnahmen unter Einschluss der OIS eingeleitet wurden. Gleiches erfolgte in einem Gebiet von Rheinland-Pfalz, das an Nordrhein-Westfalen angrenzt. Die Maßnahmen schienen erfolgreich zu sein, da zuletzt am 3. Februar bzw. am 28. März 2006 im Landkreis Euskirchen bzw. Ahrweiler virologisch positive Befunde für Schweinepest erhoben wurden und in der Folge bis November 2006 trotz fortlaufender klinischer und labordiagnostischer Untersuchungen aller geschossenen und verendeten Schweine nur negative Ergebnisse erzielt wurden.
Seit 3. November bis 31. Dezember 2006 kam es dann wiederum im Landkreis Euskirchen in den Gemeinden Euskirchen und Bad-Münstereifel zu 37 Feststellungen bei Wildschweinen. Epidemiologische Untersuchungen ergaben, dass sich das Kerngebiet aller Seuchenausbrüche seit 2002 in einem geschlossenen Waldgebiet von etwa 12.000 ha befindet. Darin wurden zwei unterschiedliche Jagdstrategien praktiziert. Während die Bejagung der Wildschweine im Kerngebiet für Schweinepest (etwa 4.000 ha groß) nur im Zeitraum von Oktober bis Dezember über Drückjagden erfolgt, wird Schwarzwild im umgebenden Jagdgebiet durch die so genannten „Ansitzjäger“ ganzjährig bejagt. Möglicherweise begründet sich hierin das scheinbar wellenförmige Auftreten der Schweinepest in dieser Region. Die Fragestellung, ob Residualherde oder Neueinträge des Schweinepestvirus dafür verantwortlich sind, wird

gegenwärtig bearbeitet. Fest steht, dass für alle Seuchenfälle seit 2002 der Subtyp 2.3 Rostock verantwortlich ist.

Epidemiologie und Bekämpfung der Klassischen Schweinepest (KSP) bei Wildschweinen und die potentielle Nutzung einer neu entwickelten Lebendmarkervakzine
Kramer, M., Vesely, J., Staubach, C., und Beer, M.*
(in Zusammenarbeit mit F. Koenen [CODA-CERVA, Department of Virology, Ukkel, Belgien], V. Guberti [Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Ozzano Emilia, Italien], V. Moennig [Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover] und G. Kulcsár [Institute for Veterinary Medicinal Products (IVMP), Department of Virology, Budapest, Ungarn])

Im Rahmen eines EU-Forschungsprojektes mit dem Titel „Epidemiology and control of Classical Swine Fever (CSF) in wild boar and potential use of a newly developed live marker vaccine", Acronym: CSFVACCINE & WILD BOAR, werden Fragestellungen bearbeitet, die insbesondere zu einem besseren Verständnis der Übertragung des KSP-Virus in der Wildschweinpopulation und der Übertragungsrisiken zwischen Haus- und Wildschweinen beitragen sollen. Obwohl gegenwärtig erhebliche Datenmengen verfügbar sind, fehlt es dennoch an Koordination und wissenschaftlicher Bewertung der Daten. Daher soll eine tiefgehende Beschreibung der Epidemiologie der KSP-Infektion unter Nutzung der Erfahrungen in verschiedenen Regionen Europas dazu führen, ein aussagefähiges Populations- und Infektionsmodell zu erarbeiten. Dafür werden auch die Daten der europäischen Datenbank über das KSP-Monitoring in verschiedenen Ländern Europas genutzt.

Weitere Projekte

Studien zur Pathogenese von Infektionen mit schwach virulentem KSPV
Klopfleisch, R., Kaden, V., Lange, E., Blohm, U., Köllner, B. und Teifke, J.P.

Wechselwirkung viraler und bakterieller Mischinfektionen
Kaden, V., Polster, U., Klopfleisch, R., Lange, E. und Teifke, J.P.

Entwicklung von rekombinanten Markerimpfstoffen
Meyers, G. und Schürmann, E.-M.

Epizone: WP4.1 Real-time PCR Diagnostik – Standardisierung und Harmonisierung von real-time RT-PCR Systemen zum Nachweis von CSFV, NDV, AIV, FMDV und BTV
Hoffmann, B., Utke, K. und Beer, M.

1.4.2 Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV)

Das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) ist in der Rinderpopulation weltweit verbreitet und stellt ein ernst zu nehmendes wirtschaftliches Problem für die Landwirtschaft dar. Der Erreger wird in das Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae* eingruppiert. Aufgrund von Genomsequenzcharakteristika werden BVDV-Isolate in die zwei Spezies BVDV-1 und BVDV-2 unterteilt. Neben schweren hämorrhagischen Erkrankungen, die nach Infektion mit manchen BVDV-2 beobachtet wurden, spielen vor allem BVDV-Infektionen von trächtigen Tieren eine wichtige Rolle, denn das Virus wird häufig auf den Fötus übertragen, was zu Aborten oder zur Geburt persistent infizierter Kälber führen kann. Persistent infizierte Tiere bilden das entscheidende Erregerreservoir für die Aufrechterhaltung der Infektionskette. Als Folge der persistenten Infektion können die Tiere zudem an der so genannten Schleimhauterkrankung („mucosal disease", MD) erkranken, die durch eine zytopathogene Variante des persistierenden Virus ausgelöst wird und immer tödlich verläuft. Die laufenden Arbeiten zum BVDV beschäftigen sich mit der Erforschung biologischer Mechanismen und der Schaffung von Grundlagen für die Herstellung besserer Vakzinen.

Grundlagen der Bildung infektiöser Virionen

Charakterisierung konservierter Genomsequenzen im Glykoprotein E2 des BVDV

Reimann, I.*, Granzow, H. und Beer, M.

Zwei hochkonservierte Regionen im Glykoprotein E2 der Pestiviren, die vermutlich ein Fusionspeptid bzw. ein Disulfid-Isomerase-Motiv darstellen, wurden hinsichtlich ihrer Funktion bei der Infektion von Zellen mit Pestiviren untersucht. Mit Hilfe von BVDV-Mutanten mit Substitutionen oder Deletionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren in diesen Sequenzabschnitten konnte ermittelt werden, welche Aminosäuren essentiell für die Vermehrungsfähigkeit von BVDV sind. Von Fusionspeptid-Mutanten mit einer Deletion des hochkonservierten Glycins^{828} oder mit einer Substitution des Glycins^{828} zu Alanin sowie von BVDV-Mutanten mit einem Austausch des konservierten Tryptophans^{899} zu Alanin im Disulfid-Isomerase-Motiv war es nicht möglich, infektiöses Virus zu generieren. RT *real-time* PCR-Analysen zeigten, dass nach RNA-Transfektion alle generierten Mutanten in den Zellen effektiv replizierten, von nicht vermehrungsfähigen Mutanten aber keine Virus-RNA ausgeschleust wurde. Zudem wurde durch Western-Blot-Analysen festgestellt, dass bei allen nicht vermehrungsfähigen Mutanten sowohl die E2-E2-Homodimerisierung als auch die E1-E2-Heterodimerisierung, die essentiell für die Entstehung infektiöser Virionen zu sein scheint, erheblich gestört war. Die genannten konservierten Regionen spielen somit nicht nur eine wichtige Rolle bei der Fusion von BVDV mit zellulären Membranen, um einen Eintritt in die Wirtszelle bzw. um eine Freisetzung von Virionen aus der Zelle zu ermöglichen, sondern auch für die Dimerisierung von E1 und E2 und damit für die Bildung reifer, infektiöser Virionen.

Untersuchungen zum Interferenzphänomen bei BVDV

Wegelt, A., Beer, M. und Reimann, I.*

Das Phänomen der Virusinterferenz ist bei zahlreichen Viren, darunter auch Pestiviren, beschrieben. Die Mechanismen, die dazu führen, sind jedoch weitgehend unklar. Bei BVDV werden als Ursachen die Expression des Glykoproteins E2 sowie die Stärke der RNA-Replikation des erstinfizierten Virus diskutiert. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden BVDV-Replikons mit Deletionen im Genombereich der Strukturproteine sowie der Autoprotease N^{pro} in bovine Zellen transfiziert und mit einem homologen, EGFP-exprimierenden Virus überinfiziert. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die Blockade der Superinfektion ausschließlich auf die Replikationsstärke der viralen RNA, nicht aber auf die Expression der einzelnen Strukturproteine oder N^{pro} zurückzuführen ist. So konnten mit zp BVDV-Replikons tranfizierte Zellen im Gegensatz zu mit nzp BVDV-Replikons transfizierten Zellen nicht mit einem homologen Virus superinfiziert werden. Analog dazu ließen sich mit nzp BVDV-infizierte Zellen mit einem homologen Virus superinfizieren, während dies bei mit zp BVDV-infizierten Zellen nicht möglich war.

Charakterisierung attenuierender Mutationen und viraler Virulenzfaktoren

Meyers, G.*, Bintintan, I., Schürmann, E.-M. und Tews, B.

Das Strukturglykoprotein E^{rns} stellt einen Virulenzfaktor von Pestiviren dar. Dabei spielt die intrinsische RNase-Funktion des Proteins eine entscheidende Rolle. Sie ist für die Virusvermehrung in Gewebekulturzellen nicht essentiell, bewirkt aber im infizierten Tier eine erhebliche Steigerung der Symptomatik und Erhöhung der Konzentration von infektiösen Viren im Blut. Die diesen Effekten zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch ungeklärt. Es wurde deshalb mit einer eingehenden Analyse der biochemischen Eigenschaften des Proteins begonnen. E^{rns} wird von infizierten Zellen sezerniert, was höchstwahrscheinlich darauf beruht, dass das Protein einen ungewöhnlichen Membrananker besitzt. Die genauere Charakterisierung dieser Sequenz ergab Hinweise darauf, dass sie sich in eine so genannte amphipatische Helix faltet, die über ihre hydrophobe Seite mit Lipiden interagiert und so das Protein in der Membran verankert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Struktur planar in die Membran eingelagert wird. Die Untersuchungen werden mit dem Ziel fortgesetzt, die Bedeutung des ungewöhnlichen Membranankers für die Sekretion des Proteins und deren Funktion in Bezug auf die Virulenz des Erregers zu testen.

Die Inaktivierung der E^{rns} RNase stellt einen interessanten Ansatz zur gezielten Attenuierung des Virus und damit zur Erzeugung verbesserter Vakzinen dar. BVDV Lebendvakzinen haben bisher den Nachteil, dass sie in trächtigen Tieren auf den Fötus übertragen werden können und zu Aborten, Missbildung oder

Mumifizierung der Föten oder zur Etablierung persistenter Infektionen führen können. Für die Vakzineentwicklung ist deshalb von Interesse, die Wirkung von attenuierenden Mutationen im Hinblick auf die Häufigkeit der diaplazentaren Infektion von Föten zu untersuchen. In den vergangenen Jahren wurden hochgradig attenuierte BVDV-Mutanten mit Deletionen eines oder mehrerer Codons der viralen RNA hergestellt. Die Genomveränderungen führten zur Inaktivierung der RNase Funktion von E^{rns} bzw. zur weitgehenden Deletion der Sequenz, die für das virale Nichtstrukturprotein N^{pro} kodiert. N^{pro} ist eine Protease, die mit der angeborenen Immunantwort von Zellen gegen eine virale Infektion interferiert. Nach Infektion von trächtigen Rindern konnte gezeigt werden, dass weder eine RNase inaktivierende Mutation noch eine Deletion des N^{pro} den diaplazentaren Transfer der Viren und die Etablierung persistenter Infektion verhindern, und beide Mutationen somit keine wesentliche Verbesserung der Eigenschaften von Impfviren bewirken würden. Überraschenderweise zeigte sich aber, dass nach einer Kombination beider Veränderungen in einer Doppelmutante keine diaplazentare Infektion mehr auftrat, obwohl das veränderte Virus in den Tieren replizierte, eine deutliche Immunreaktion hervorrief und sich zudem in Gewebekultur vergleichbar gut wie die Einzelmutanten vermehrte. Um zu überprüfen, ob dieser Befund spezifisch für den zunächst getesteten BVDV-2 Virusstamm ist, wurde ein neuer infektiöser BVDV-1 Klon etabliert und davon ausgehend Mutanten erzeugt, die eine RNase inaktivierende Veränderung, eine Deletion der N^{pro} kodierenden Region oder eine Kombination beider Marker enthalten. Erste Tests mit diesen Viren bestätigten die o.g. Ergebnisse, so dass davon auszugehen ist, dass solche Doppelmutanten eine gute Basis für die Entwicklung besserer BVDV-Impfstoffe darstellen.

Entwicklung neuer Pestivirusvakzinen mit Hilfe von Replikons

Etablierung und Charakterisierung eines BVDV-2 cDNA Klons als Basis für weitere Deletionsmutanten

Mischkale, K., Reimann, I. und Beer, M.*

Alle in Deutschland zugelassenen BVDV-Impfstoffe enthalten bislang ausschließlich den Genotyp 1. Aufgrund der hohen antigenen Diversität zwischen den beiden BVDV-Genotypen schützen Impfungen nur partiell gegen BVDV-2. Neuartige Impfstoffe, welche vor allem durch die Etablierung infektiöser cDNA-Klone von Pestiviren möglich waren, zielen darauf ab, die Vorteile der hohen Wirksamkeit der Lebendimpfstoffe und die Sicherheit der inaktivierten Vakzinen zu vereinen. Des weiteren bieten sie die Möglichkeit, Markerimpfstoffe zu entwickeln, die eine DIVA-Strategie ermöglichen. Für die Entwicklung einer rekombinanten BVDV-2 Vakzine wurde ein infektiöser cDNA-Klon des hochpathogenen BVDV-2 Stammes US890 etabliert. Beim Vergleich der Wachstumseigenschaften in Zellkultur und durch Sequenzanalysen des rekombinanten Virus konnten nur sehr geringe Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. In einem ersten Infektionsversuch soll zunächst geklärt werden, ob sich das rekombinante Virus auch *in vivo* wie das Wildtypvirus verhält.

Untersuchungen zur Verpackung von bicistronischen BVDV-Replikons

Wegelt, A., Reimann, I.* und Beer, M.

BVDV-Replikons mit Deletionen im Genombereich der Strukturproteine lassen sich mit Hilfe der Zelllinie PT_805, die sämtliche BVDV-Strukturproteine exprimiert, verpacken. Ob eine gegenseitige *trans*-Komplementierung durch Ko-Transfektion von Replikon-RNAs möglich ist, wurde mit bicistronischen BVDV-Replikons untersucht, die neben einer Deletion im Genombereich der Strukturproteine (C, E^{rns}, E1, E2) eine Insertion einer EMCV-IRES sowie des EGFP- bzw. DsRedExpress-Gens in der 3' UTR Region enthielten. Dadurch konnte die gegenseitige Verpackung in Virionen durch Fluoreszenzmikroskopie ohne zusätzliche Immunfluoreszenzfärbung beurteilt werden. Die Untersuchungen ergaben, dass jede Deletion eines einzelnen Strukturproteingens durch Ko-Transfektion geeigneter Replikon-RNA in bovine Zellen *trans*-komplementiert werden kann. BVDV-Replikons mit Deletionen in benachbarten Strukturprotein-Genen ließen sich nicht miteinander verpacken. Vermutlich stehen durch die Deletionen in angrenzenden Genomabschnitten wichtige Prozessierungsstellen nicht mehr zur Verfügung.

Chimäre Pestiviren als neuartige Vakzinen

Reimann, I.* und Beer, M.

Das chimäre Pestivirus CP7_E2alf, das auf der Grundlage des infektiösen cDNA-Klons cp7 durch den Austausch des BVDV-Hüllproteins E2 gegen das E2 vom KSPV-Isolat Alfort 187 konstruiert wurde, erwies sich bereits in zahlreichen Immunisierungsversuchen als ein guter Kandidat für einen KSPV-

Markerlebendimpfstoff. Cp7_E2alf kann nach Adaptation an porzine Zellen mit Virustitern von bis zu 10^6 KID_{50}/ml vermehrt werden. Die Adaptation erfolgte reproduzierbar durch eine spontane Mutation im BVDV-E^{RNS} (G^{479} zu R) während der ersten drei bis vier Passagen in porzinen Zellen. Um ein stabiles Wachstum des CP7_E2alf bereits direkt nach der RNA-Transfektion zu erreichen, wurde durch eine gerichtete Mutagenese ein entsprechender Aminosäureaustausch im Ausgangskonstrukt vorgenommen. Sequenzanalysen zeigten, dass die eingeführte Mutation über mehr als sechs Passagen stabil blieb. E1-E2-Heterodimere sind ein essentieller Bestandteil infektiöser Virionen. In Western-Blot-Analysen wurde jedoch deutlich, dass in mit CP7_E2alf infizierten Zellen im Gegensatz zu in mit KSPV-Alfort 187 infizierten Zellen die Heterodimerisierung von E1 und E2 beeinträchtigt war, was einen negativen Einfluss auf die Bindung des Virus an die Wirtszelle, das Eindringen in die Zelle oder auch auf die Freisetzung der Virionen haben kann. Daher wurden neue chimäre Viren generiert, in denen sowohl BVDV-E2 als auch BVDV-E1 gegen die entsprechenden KSPV-Hüllproteine substituiert wurden und zusätzlich die Mutation R^{479} eingeführt wurde. Das chimäre Virus CP7_E1E2alf erreicht in porzinen Zellen Virustiter von mehr als 10^7 KID_{50}/ml und bildet effizient E1-E2-Heterodimere aus. Erste Impfversuche mit diesem Konstrukt zeigten, dass alle immunisierten Schweine komplett vor einer letalen KSPV-Infektion geschützt waren.

Weitere Projekte

Molekulare Grundlagen der Zytopathogenität von BVDV
Meyers, G.

1.4.3 West-Nile-Virus (WNV)

Das West-Nile-Virus (WNV) ist ein „arthropode-borne" (Arbo-)Virus innerhalb der Gattung *Flavivirus* in der Familie *Flaviviridae*. Es gehört zur Gruppe der Japanese encephalitis, wird durch Moskitos übertragen und besitzt ein hohes zoonotisches Potential, wobei Wildvögel als Virusreservoir anzusehen sind. Das WNV wurde 1937 erstmalig im West Nile District des nördlichen Uganda bei einem Menschen beschrieben und nach größeren Epidemien (1952 Israel, 1962 Frankreich, 1973 Südafrika, 1980 Indien, 1996 Rumänien) ist es seit 1999 (Russland, Israel, USA) auf allen Kontinenten nachweisbar.

Prävalenz, Diagnostik und Virulenzfaktoren der West-Nile-Viren
Ziegler, U.*, Hoffmann, B., Ulrich, R.G., Beer, M., Globig, A., Harder, T., Müller, T., von Rönn, J. und Groschup, M.H.

Erste Studien in Deutschland belegen auch hier ein Vorkommen von WNV-reaktiven Antikörpern in der Vogelpopulation (10 % der untersuchten Seren), jedoch wurde weder infektiöses Virus noch Virus-Antigen in den Proben nachgewiesen. Gleichzeitig könnten aber besonders die Zugvögel aus WNV-Endemiegebieten ein potentielles Risiko für die Einschleppung des Virus nach Deutschland darstellen. Für seroepidemiologische Untersuchungen wurden insgesamt ca. 670 Blutproben von unterschiedlichen Wildvogelarten (Rauch- und Mehlschwalbe, Trauerschnäpper, Weißstorch) in Schleswig-Holstein, Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg gesammelt. Darüber hinaus stehen Proben aus dem AIV-Wildvogelmonitoring für die Untersuchungen zur Verfügung.
Ferner wurde am FLI ein RT *real-time* PCR-System zum Nachweis von WNV-Genom entwickelt. Der Test ermöglicht die sehr sensitive Detektion der beiden WNV-Subtypen sowie des nahe verwandten Kunjin-Virus von weniger als 1.000 Genomäquivalenten/ml. Die Sensitivität und Spezifität des RT *real-time* PCR-Systems wurde mit Hilfe von Referenzproben aus dem OIE-Referenzlabor in Ames (USA) und durch die erfolgreiche Untersuchung von Proben eines WNV-Ringtests, die das Robert Koch-Institut zur Verfügung stellte (Dr. M. Niedrig), bestätigt. Ferner wurden zwei weitere RT *real-time* PCR-Systeme etabliert, die spezifisch den WNV-Stamm New York detektieren. Die genannten PCR-Assays stehen nunmehr für Anwendungen in der Diagnostik und zukünftige Pathogenese-Studien zur Verfügung.

1.5 ORTHOMYXOVIREN

1.5.1 Aviäre Influenzaviren

Die Klassische Geflügelpest (hochpathogene aviäre Influenza, HPAI) stellt eine Infektion mit hochpathogenen aviären Influenzaviren (HPAIV) dar, die sich bislang ausschließlich aus den Subtypen H5 und H7 rekrutieren. HPAIV-Infektionen verlaufen in Hühnervögelbeständen mit sehr hoher Mortalität. In Gänse- und Entenbeständen ist der Verlauf milder, jedoch ist auch hier mit einer schweren, meist zentralnervösen Klinik und erheblichen Tierverlusten zu rechnen. Aquatisch lebende Wildvögel sind das Reservoir niedrigpathogener aviärer Influenza A Viren (NPAIV); aus den Subtypen H5 und H7 können sich durch Mutation neue HPAIV-Stämme bilden. Die seit 1997 in Südostasien durch HPAIV des Subtyps H5N1 prävalente Geflügelpest hatte sich 2005 und 2006 bis nach Mitteleuropa ausgebreitet. Das H5N1 HPAI Virus asiatischer Herkunft besitzt ein erhebliches zooanthroponotisches Potential. In den Mitgliedsstaaten der EU waren vor allem Wildvögel von der Infektion betroffen. Hausgeflügelbestände wurden nur vereinzelt infiziert. Menschliche Infektionen traten in der EU bisher nicht auf.

1.5.1.1 Molekularbiologie des Virus der klassischen Geflügelpest

Molekularbiologie des Virus der klassischen Geflügelpest und reverse Genetik
Weber, S.*, Mundt, E., Veits, J., Harder, T., Werner, O. und Stech, J.

Ziel der Arbeiten ist die Untersuchung des Einflusses der Spaltstelle des Haemagglutinins auf die Virulenz aviärer Influenza-A-Viren mit Hilfe der reversen Genetik. Alle acht Genomsegmente (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M, NS) des NPAIV-Stammes A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) und des HPAIV-Stammes A/chicken/Italy/445/99 (H7N1) sowie das Segment 4 (HA) des HPAIV-Stammes A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) wurden amplifiziert, in den Vektor pHW2000 kloniert und sequenziert. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde dem HA3 des apathogenen Stammes H3N8 eine polybasische Spaltsequenz eingefügt. Unter Verwendung des Virus-Rescue-Systems auf Basis des A/seal/Mass/1/80 (H7N7) wurden single-gene Virus-Reassortanten hergestellt, die aviäres HA exprimierten (HA7; HA5; HA3; und mutierte HA3pb7 und HA3pb5 mit polybasischer Spaltsequenz von HA5 bzw. HA7). Nach experimenteller Infektion vier Wochen alter SPF-Hühner mit einer Dosis von $10^{6,5}$ EID_{50} erkrankten alle Tiere, denen HA7-exprimierendes Virus appliziert wurde, schwer, während die Tiere, die HA3 oder mutiertes HA3 erhalten hatten, nicht oder nur vereinzelt leichte Symptome zeigten. Mit der Etablierung und Nutzung reverser genetischer Systeme ist es möglich, detaillierte Einblicke in die molekularbiologischen Vorgänge, die für die Pathogenität von Bedeutung sind, zu erhalten.

Molekularbiologische Charakterisierung hochpathogener aviärer Influenzaviren
Weber, S.*, Harder, T., Starick, E.*, Beer, M., Werner, O., Hoffmann, B., Mundt, E. und Mettenleiter, T.C.
Im Rahmen des Auftretens von HPAIV vom Subtyp H5N1 2006 in Deutschland wurden alle acht Genomsegmente eines AIV-Isolates von einem Schwan von der Insel Rügen [A/whooper swan/Germany/R65/2006 (H5N1)] sowie von einem AIV-Isolat von einer Rüganer Katze [A/cat/Germany/R606/2006 (H5N1)] kloniert und die vollständigen Sequenzen ermittelt. Beide Isolate sind auf Aminosäure-Ebene weitestgehend identisch und unterscheiden sich nur in einer Aminosäure in der Position N110D des HA. Die phylogenetische Analyse der Sequenzen ordnet beide Viren der Qinghai-Linie zu; engste Verwandte sind Isolate aus Astrachan im Süden Russlands. Um Aussagen über möglicherweise verschiedene Einträge zu erhalten, wurden die acht AIV-RNA-Segmente eines Isolates vom Bodensee [A/pochard/Germany/R348/2006 (H5N1)] kloniert und sequenziert. Die AIV-Isolate von Rügen unterschieden sich in neun Aminosäure-Positionen von dem Isolat vom Bodensee: PB1 (S527V; R531K); PA (I465V); HA (V5F; F8L; N403D); NA (N228S; D316G) und NS (S223P). Die Unterschiede zwischen den Isolaten von der Insel Rügen und dem Isolat vom Bodensee sind signifikant. Daher wurden 23 Isolate aus sieben Bundesländern 15 verschiedenen Wildvogelarten sowie aus dem infizierten Putenbestand untersucht. Zum Vergleich wurde zusätzlich das Isolat einer mit geringpathogenem H5N1-Virus (LPAIV) infizierten Wildente von Ende 2005 mit einbezogen. Von 19 Isolaten liegen die kompletten HA-Sequenzen vor, von den verbleibenden fünf Isolaten 93 % des HA-Gens (nt82 – nt1753). Zusätzlich wurde ein Teil des für die Neuraminidase kodierenden Gens sequenziert

(nt526 – nt1063). Die phylogenetische Analyse sowohl der HA- als auch der NA-Sequenzen wies zwei verschiedene Cluster nach. Eine Gruppe repräsentiert Isolate überwiegend aus den nördlichen Bundesländern, die zweite Gruppe Isolate aus BW und BY. Es gab auch einige wenige Überschneidungen zwischen beiden Gruppen in Bezug auf ihre geographische Herkunft. Dies weist auf zwei unabhängige Einträge von HPAIV H5N1 Asia nach Deutschland hin. Die HA-Sequenz des geringpathogenen H5N1-Virus zeigte höchste Homologie zu Viren aus Stockenten der letzten Jahre aus den Niederlanden, Dänemark und Schweden – ein weiteres Indiz dafür, dass das in Deutschland aufgetretene HPAIV H5N1 seinen Ursprung nicht in einem schon seit längerem kursierenden LPAIV-H5 aus diesen Breiten hat.

Molekulare Diagnostik der aviären Influenzavirusinfektion: Methodenentwicklung
Harder, T.*, Hoffmann, B., Durban, M., Starick, E., Globig, A. und Beer, M.

Mit der Publikation des Diagnostikhandbuches für aviäre Influenza durch die Europäische Kommission 2006 sind moderne, molekulare Techniken des Nachweises von AIV auch offiziell in detaillierter Form in den Kanon der diagnostischen Methoden aufgenommen und damit rechtlich verankert worden. Die Ausgliederung des Diagnostikhandbuches aus der EU-Richtlinie 2005/94/EU erlaubt darüber hinaus zeitnahe inhaltliche Anpassungen, sofern bestehende Methoden weiterentwickelt werden oder neue validierte Verfahren zur Verfügung stehen.
Die molekulare AIV-Diagnostik beruht auf dem gleichen Kaskadenprinzip wie die klassische Diagnostik: Zunächst wird eine Probe auf Vorhandensein von Influenza-A-Virus untersucht. Hierzu wird ein Fragment des hochkonservierten M-Segmentes amplifiziert. Im positiven Fall werden in weiteren PCR-Untersuchungen die Subtypen H5 und H7 nachgewiesen bzw. ausgeschlossen. Im positiven Fall wird in der dritten Stufe mittels Nukleotidsequenzierung eine Pathotypisierung vorgenommen.
Im FLI wurden validierte Verfahren dieser Diagnostikkaskade weiter optimiert, so dass nun mittels RT *real-time* PCR-Techniken eine Endbefundung in wenigen Stunden nach Eintreffen der Probe erfolgen kann. Insbesondere die Entwicklung einer Alternativmethode zur Nukleotidsequenzierung von H5-Subtypvarianten der Qinghai-Linie des hochpathogenen H5N1 hat die Dauer bis zur Endbefundung deutlich reduziert. Hierbei wird eine Sonde eingesetzt, die direkt im kritischen Bereich des Targetgens bindet und – im positiven Fall – einen eindeutigen Rückschluss auf die potentielle Pathogenität des Virus zulässt. Weiterhin wurden Methoden der automatisierten RNA-Extraktion optimiert. Hierdurch werden Untersuchungen auch großer Probenzahlen innerhalb kurzer Zeit durchführbar. Dies ist vor allem in Ausbruchssituationen unerlässlich, aber auch für Tierversuche, bei denen regelmäßig größere Probenmengen anfallen, ein großer Vorteil.
Weitere Projekte befassen sich mit der molekularen Subtypisierung mittels konventioneller RT-PCR, z. T. in Verbindung mit Nukleotidsequenzierung. Ziel ist es, eine auf HA- und NA-Segmente bezogene molekulare Subtypisierung von Isolaten innerhalb von 1 – 2 Tagen in die Routinediagnostik zu überführen.

Molekulare Diagnostik aviärer Influenzavirusinfektionen: Analyse von Isolaten 2006
Starick, E.*, Harder, T., Globig, A., Hoffmann, B. und Werner, O.

Im Zeitraum von Mitte Februar bis Ende März 2006 wurden von 91 überwiegend Originalproben (RNA aus Tupfern oder Organmaterial), von denen zuvor in der RT *real-time* PCR der Subtyp H5N1 nachgewiesen worden war, kurze Bereiche rund um die HA_0-Spaltstelle sequenziert, um Aussagen zur Pathogenität zu erhalten. In 74 Fällen konnte in diesen Proben hochpathogenes AIV nachgewiesen werden, 17mal war das Probenmaterial für die Methode nicht geeignet. In weiteren 18 Proben (16 von Wildvögeln, zwei von Hausgeflügel) wurde mittels Spaltstellensequenzierung geringpathogenes H5-Virus detektiert. Von 16 untersuchten Proben vom Subtyp H7 erwiesen sich dreizehn ebenfalls als geringpathogen, drei Proben reagierten negativ. In jedem Falle dienten die erhaltenen Sequenzdaten zugleich einer ersten Charakterisierung der Viren hinsichtlich ihrer Verwandtschaft mit aus der Literatur bekannten Sequenzen.
Darüber hinaus wurde von 25 AIV-Isolaten (23 von Wildvögeln, zwei von Hausgeflügel) mittels Subtyp-spezifischer RT-PCR-Tests der Hämagglutinin-Subtyp ermittelt. Dabei konnten Viren der Subtypen H1, H6, H10, H11, H12 und H13 nachgewiesen werden.

1.5.1.2 Pathogenesestudien zu Influenzavirusinfektionen bei Geflügel und Schwein

Pathologisch-anatomische, histopathologische und immunhistologische Untersuchungen zur Pathogenese natürlicher Infektionen mit HPAIV H5N1/Asia bei Schwänen, Katzen und beim Steinmarder

Beer, M., Globig, A., Harder, T.C., Hoffmann, B., Klopfleisch, R., Mettenleiter, T.C., Niebuhr, M., Starick, E., Teifke, J.P.*, Vahlenkamp, T.W. und Werner, O.
(in Zusammenarbeit mit Gerst, S., Uhl, W., Wolf, C. und Wolf, P.U. [LALLF Rostock])

Todesfälle bei wild lebendem Wassergeflügel sind nach Infektionen mit hochpathogenen aviären Influenzaviren (HPAIV) eher ungewöhnlich. Während des durch ein aus Asien stammendes Virus des Subtyps H5N1/Qinghai in Deutschland und anderen mittel- und nordeuropäischen Ländern verursachten Geflügelpestgeschehens im Frühjahr 2006 wurden jedoch zahlreiche verendete Höcker- und Singschwäne in unterschiedlichen Gegenden beobachtet. Im Unterschied zu früheren Berichten haben sich im Rahmen der europäischen Ausbrüche Schwäne als hochempfänglich und am stärksten betroffene Spezies erwiesen. Bei Höcker- und Singschwänen, die nach natürlicher Infektion mit HPAIV H5N1 gestorben waren, ergab sich, dass die zuverlässigsten Sektionsbefunde multifokale Blutungen und Nekrosen des Pankreas, hochgradige Stauungslunge und Lungenödem sowie subepikardiale Petechien waren. Die wesentlichen histopathologischen Befunde waren akute Pankreasnekrosen, eine multifokal nekrotisierende Hepatitis und nicht eitrige Enzephalitis mit Neuronennekrosen. In den Nebennieren fanden sich konstant Rinden- und Marknekrosen. Milz und Peyer'sche Platten wiesen geringfügige Lymphozytennekrosen auf. Immunhistologisch konnte Nukleoprotein von HPAIV intraläsional in Pankreas, Nebennieren, Leber und Gehirn nachgewiesen werden. Im Gehirn fand sich Influenzavirusantigen in zahlreichen Neuronen und Gliazellen, besonders die Purkinje-Zellen reagierten mit kräftigen zytoplasmatischen und intranukleären Signalen. In Einzelfällen waren die Ependymzellen des Rückenmarks ebenfalls positiv. Im Lungengewebe war interessanterweise Influenzavirusantigen in wenigen Endothelzellen, nicht jedoch in Pneumozyten, zu finden. Die ausgedehnte Infektion des ZNS unterstützen die klinischen Beobachtungen, dass durch den ausgeprägten Neurotropismus von H5N1-HPAIV Orientierungsstörungen resultieren. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Mechanismen zu klären, die zum finalen Kreislaufversagen, Lungenödem und raschen Tod der Schwäne beitragen.
In den am stärksten betroffenen Gegenden von Rügen kam es zu einem Transspeziesübergang von HPAIV H5N1 auf Säugetiere; hier waren drei streunende Hauskatzen und ein Steinmarder *(Martes foitina)* betroffen. HPAIV H5N1/Qinghai wurde von drei Katzen nach natürlicher Infektion isoliert. Die Teilsequenz des Hämagglutinin-Gens erwies sich als sehr eng verwandt mit der von einem H5N1-HPAIV aus einem gestorbenen Höckerschwan *(Cygnus cygnus)* aus Nordrügen. Bei der Sektion lag eine granulomatöse Pneumonie als Folge des Befalls durch *Aelurostrongylus sp.* vor. Histopathologisch fanden sich bei allen drei Katzen eine bronchointerstitielle Pneumonie und ausgeprägte multifokale Lebernekrosen. Zusätzlich lag bei allen Tieren eine Lymphozytennekrose in Milz und Peyer'schen Platten sowie Nebennierenrindennekrosen vor. Immunhistologisch konnte Nukleoprotein von HPAIV intraläsional in Lungen, Leber, Nebennieren und im lymphatischen Gewebe nachgewiesen werden. Obwohl in Oropharynx und dem oberen Respirationstrakt immunhistologisch nur minimale Mengen von Influenzavirusantigen nachweisbar waren, erwiesen sich die Tupferproben als für die Diagnostik mittels quantitativer RT *real-time* PCR hervorragend geeignet. Die Ergebnisse zeigen, dass streunende Katzen in von Geflügelpest bei Wildvögeln betroffenen Gebieten für diese letal verlaufende Infektion gefährdet sind. Im Unterschied zu experimentellen Infektionen stellen neben der Bronchopneumonie die Lebernekrosen die Hauptläsionen nach natürlicher Infektion der Katzen dar, so dass der fulminante Krankheitsverlauf bei diesen Tieren auch durch die Veränderungen dieses Organs zu erklären ist.
Als Folge der natürlichen Infektion eines Steinmarders *(Martes foina)* konnte durch histopathologische Utersuchung eine diffuse, nicht eitrige Panenzephalitis mit perivaskulärem „Cuffing", multifokaler Gliose und Neuronennekrosen beobachtet werden. Im exokrinen Pankreasgewebe waren vereinzelte Epithelzellnekrosen nachweisbar. Immunhistologisch konnte in beiden Organen Influenzavirusantigen nur in Neuronen, Gliazellen oder pankreatischen Drüsenazini dargestellt werden, so dass sich durch dieses Verteilungsmuster der histologischen Läsionen und des Antigens diese Tierart von den Katzen unterscheidet.
Als Übertragungsweg kommt vor allem der Kontakt mit bzw. die Aufnahme von an HPAI verendeten Wildvögeln in Frage.

1.5.1.3 Überwachungsuntersuchungen zum Vorkommen von Influenzaviren bei Hausgeflügel und Wildvögeln

Untersuchungen zum Vorkommen von Influenzaviren bei Wildvögeln und Hausgeflügel
Globig, A., Harder, T.*, Starick, E., Staubach, C., Unger, F., Poetzsch, C., Conraths, F.J., Werner, O. und Beer, M.

Im Rahmen des Monitorings bei Wildvögeln und Hausgeflügel 2006 wurden durch die Landesuntersuchungseinrichtungen insgesamt 1.337 AI-verdächtige Proben von Wildvögeln an das NRL eingesandt. In den Bundesländern wurden insgesamt mehr als 65.000 Proben von Wildvögeln untersucht. Weitere ca. 1.100 Proben von Wildvögeln stammten aus Einsendungen von Naturschutzbehörden und ornithologischen Projekten und wurden direkt im NRL untersucht. Die Untersuchungen erfolgten mittels RT *real-time* PCR unter Berücksichtigung der molekularen Kaskadendiagnostik wie im EU-Diagnostik-Handbuch beschrieben.
Insgesamt konnte in 344 Fällen hochpathogenes H5N1-Virus der Qinghai-Linie im Rahmen der Ausbrüche im Frühjahr 2006 in natürlich infizierten Wildvögeln detektiert werden. Hinzu kommen drei Katzen und ein Steinmarder, die mit H5N1-HPAIV-Infektionen auf der Insel Rügen angetroffen wurden. Darüber hinaus wurden 255 Non-H5N1-AIV Infektionen mittels PCR bestätigt. Aus diesen PCR-positiven Probenmaterialien konnten bislang 48 AIV-Isolate angezüchtet werden. Die noch nicht vollständig abgeschlossene Typisierung dieser Isolate zeigte, dass die Subytpen H1, H2, H3, H5, H6, H7, H10, H11, H12, H13 und H16 vertreten waren. Alle Proben/Isolate der Subtypen H5 und H7 wurden als niedrigpathogen charakterisiert.
Im zweiten Teil des Monitoringprogrammes wurden Hausgeflügelbestände nach einem epidemiologisch festgelegten Schlüssel ausgewählt und stichprobenweise untersucht. In Beständen mit Hühnervögeln wurden jeweils zehn Tiere beprobt, in Wassergeflügelbeständen waren 40 Proben erforderlich. Seren von Hühnervögeln wurden im indirekten ELISA auf AIV-spezifische Antikörper untersucht, solche von Wassergeflügel im Hämagglutinationshemmtest gegen Antigene der Subtypen H5 und H7. Diese Untersuchungen erfolgten ebenfalls zum überwiegenden Teil in den Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer. Seren mit auffälligen Reaktionen wurden im NRL nachuntersucht. Acht Bestände, die gegenüber H5 und/oder H7 seropositiv waren, wurden virologisch untersucht; aktive Infektionen mit diesen Subtypen wurden jedoch ausgeschlossen. Weitere Bestände wurden in den Ländern im Rahmen der so genannten Ausstellungsuntersuchungen im Rahmen der in der Aufstallungsverordnung festgelegten Maßnahmen auf aktive AI-Infektionen hin kontrolliert. In sechs Beständen wurden aktive AI-Infektionen angetroffen, wobei in einem Kleinstbestand von Enten ein Virus des Subtyps H5 identifiziert und als niedrigpathogen charakterisiert werden konnte. Dieser Bestand wurde gekeult. Den anderen Beständen mit einer Non-H5/H7-AI-Infektion wurde eine Bestandssperre auferlegt, bis durch das NRL die Anwesenheit von Viren der Subtypen H5/H7 ausgeschlossen werden konnte.
Im Zuge des Ausbruchsgeschehens von H5N1-HPAIV bei Wildvögeln in Deutschland war auch ein größerer gemischter Geflügelbestand in Sachsen betroffen. Während die Puten des Bestandes das Vollbild der Klassischen Geflügelpest zeigten, was zur Verdachtsäußerung und Anzeige bei den Veterinärbehörden führte, konnten bei den Gänsen dieses Betriebes bis zur Keulung und Räumung des Bestandes keine klinischen Anzeichen einer Infektion detektiert werden.

Monitoring von Wildvogelpopulationen in Deutschland mittels Wächtervögeln (Indikatortieren)
Globig, A., Mattes, D., Kraatz, U., Strunk, P., Fiedler, W., Harder, T.*, Mettenleiter, T.C. und Beer, M.

Das Prinzip von so genannten „Wächtertieren“ oder „Sentinels“ für epidemiologische infektiologische Untersuchungen hat sich als Alternative zu direkten Untersuchungen eines großen, heterogenen und schwer zugänglichen Wirtsreservoirs bewährt. Bei den Sentineltieren handelt es sich um Spezies, die dem natürlichen Wirtsreservoir gleich oder eng verwandt und gegenüber dem zu untersuchenden Agens voll empfänglich sind. Sentinels werden an Orten platziert, an denen sie möglichst uneingeschränkten Kontakt mit den wildlebenden Reservoirwirten haben können. Hierfür erstreckt sich ein großer Teil eines Geheges in seichtes Gewässer, so dass mittelbare Kontakte auch zu Wasservögeln ermöglicht werden, die nicht direkt in das Gehege kommen. Wildlebende Wasservögel stellen das Hauptreservoir aviärer Influenzaviren (AIV) dar. Stockenten gehören diesem Reservoir an. Zur Untersuchung der Häufigkeit und Subtypenvariabilität von AIV-Infektionen in Wildvogelpopulationen können daher handaufgezogene Stockenten, die in einem günstig platzierten Gehege immobilisiert sind, eingesetzt werden.

Im Herbst 2006 konnten in drei Gebieten in Deutschland mit einer dichten Population wildlebender Wasservögel (Bereich Bodensee, Binnengewässer in Brandenburg und Boddengewässer in Mecklenburg-Vorpommern) Sentinelanlagen in Betrieb genommen werden. Es wurden Lokalisationen gewählt, die vor Störungen durch Menschen geschützt sind und somit den Besuch zahlreicher Wildvogelspezies ermöglichen. In jede Anlage wurden 15 Stockenten eingesetzt, die in vierzehntägigen Abständen virologisch und monatlich serologisch untersucht werden.
Eine hohe Frequenz von Wildvogelkontakten in den Gehegen konnte vor allem für die Standorte in BB sowie MV belegt werden: Saat-, Bläss-, Graugänse; Höcker-, Singschwäne, Kiebitze, Goldregenpfeifer, Pfeif-, Stock-, Krickenten u.v.m. sammeln sich in den seichten Boddengewässern in unmittelbarer Nähe des Geheges zur Nahrungsaufnahme. Außerdem wurden im Gehege Turmfalken, Pfeifenten, Nebelkrähen und Silbermöwen beobachtet. Probleme entstanden bisher durch Verluste von Sentineltieren infolge Bejagung durch Fuchs und Habicht. Die Verluste wurden, sofern handaufgezogene Stockenten verfügbar waren, umgehend ersetzt.
Trotz ansprechender Frequentierung durch AIV-Reservoirwirte konnten in zwei Monaten des Betriebs der Sentinelanlagen (seit November 2006) noch keine Hinweise auf AIV-Infektionen der Sentinels gewonnen werden. Die Studie ist auf eine Laufzeit von mindestens zwei Jahren angesetzt.

1.5.1.4 Entwicklung und Prüfung von Impfstoffen gegen Klassische Geflügelpest

Prüfung rekombinanter Vektorimpfstoffe gegen HPAIV vom Subtyp H5
Veits, J.*, Römer-Oberdörfer, A., Fuchs, W., Helferich, D., Durban, Starick, E. und Mettenleiter, T.C.

Durch eine prophylaktische Impfung mit inaktivierten Vollvirusvakzinen können Hühner wirksam gegen die klassische Geflügelpest geschützt werden. Da diese Impfstoffe jedoch eine individuelle Applikation durch Injektion erfordern, wurden am FLI massenapplikationsfähige Lebendvirusvakzinen auf Grundlage des Newcastle Disease Virus bzw. des Virus der Infektiösen Laryngotracheitis entwickelt, welche das als Hauptimmunogen beschriebene Hämagglutinin (HA)-Gen des AIV exprimieren (siehe III. Schwerpunkt-themen, Institut für Molekularbiologie: Markervakzinen gegen aviäre Influenza).
Die am FLI entwickelten potentiellen Impfstoffe wurden in Tierversuchen mit kommerziell erhältlichen Impfstoffen verglichen und auf ihre Schutzwirkung gegen die klassische Geflügelpest geprüft.
Eine einmalige Immunisierung von SPF-Hühnern mit den Rekombinanten NDV/AIV-H5 und ILTVΔUL50-H5 verlieh Schutz vor klinischer Erkrankung nach Gabe einer letalen Dosis des homologen, HPAIV A/chicken/Italy/8/98 vom Subtyp H5N2. Die AIV-Auscheidung wurde mittels RT *real-time* PCR geprüft und war in beiden Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erheblich reduziert. Eine inaktivierte H5N2-Vollvirusvakzine schützte entsprechend, während in den Gruppen, die mit der Rekombinante ILTVΔUL0-H5 bzw. weiteren viralen Vektorvakzinen immunisiert worden waren, Tiere erkrankten und z. T. auch starben. Der unzureichende Schutz durch die ILTVΔUL0-H5-Rekombinante könnte auf eine Überattenuierung des ILTV infolge der Deletion des UL0-Gens zurückzuführen sein.
Mittels eines auf dem AIV Nukleoprotein basierenden ELISA konnte gezeigt werden, dass alle Tiere nach AIV-Infektion serokonvertierten. Damit können immunisierte von infizierten Tieren unterschieden werden sowie immunisierte und infizierte Tiere erkannt werden.
Eine NDV/AIV-H5-Rekombinante, die das HA-Gen des HPAIV-Isolates A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) exprimiert, verlieh Schutz vor klinischer Erkrankung nach Belastungsinfektion mit dem homologen, hochpathogenen, aviären Influenzavirus (HPAIV), schützte aber nur partiell vor Mortalität nach Belastungsinfektion mit einem aktuellen HPAIV-Isolat vom Subtyp H5N1. Eine NDV-/AIV-H5-Rekombinante mit Insertion des HA-Gens des HPAIV-Isolates A/chicken/Vietnam/P41/2005 (H5N1) verlieh dagegen Schutz vor einer letalen Dosis mit HPAIV-Isolaten vom Subtyp H5N1 verschiedener Herkunft (A/dk/Vietnam/TG24-01/05 und A/whooper swan/Germany/R65/2006). Ausscheidung von AIV-Belastungsvirus war entweder nicht oder nur in geringem Maße gegeben.
Trotz geringerer H5-spezifischer Antikörpertiter in Seren Lebendvirus-vakzinierter Tiere gegenüber Tieren, die mit inaktiviertem Impfstoff immunisiert wurden, war die Schutzwirkung vergleichbar und wird vermutlich über die Ausbildung einer lokalen Immunität kompensiert.
Für die Ausbildung einer Immunität ist die Aminosäuresequenz-Homologie von inseriertem HA zum AI-Belastungsvirus neben der Expressionsstärke des H5-Gens offensichtlich von entscheidender Rolle.

Entwicklung viraler Vektorvakzinen/Markervakzinen
Deckers, D., Fuchs, W., Römer-Oberdörfer, A., Schröer, D., Topfstedt, E. und Veits, J.*

siehe III. Schwerpunktthemen, Institut für Molekularbiologie: Markervakzinen gegen aviäre Influenza

Pilotstudie zum Einsatz kommerziell erhältlicher AIV-H5-Impfstoffe unter Feldbedingungen
Rudolf, M., Pöppel, M., Blohm, U., Teifke, J.P., Klopfleisch, R., Mettenleiter, T.C., Beer, M., Werner, O. und Harder, T.*

Die Impfung wird als wichtiges Instrument zur Verhütung und Bekämpfung der Klassischen Geflügelpest betrachtet. Dies gilt vor allem in Gegenden, in denen Infektionen mit HPAIV endemisch vorkommen. Inaktivierte, Subtypen-spezifische Impfstoffe sind seit Jahrzehnten kommerziell verfügbar. Allerdings existieren kaum systematische Studien zur Wirkung dieser Impfstoffe im Feldeinsatz. Die stets mit befriedigenden Ergebnissen verlaufenden experimentellen Prüfungen unter Verwendung spezifisch-pathogenfreier Hühner sind nicht notwendigerweise auf die Situation im Felde übertragbar. Dort sind ein Reihe zusätzlicher Faktoren wirksam, die die Effizienz der Impfstoffe negativ beeinflussen können.
Zur Durchführung einer statistisch abgesicherten kontrollierten Feldstudie wurden drei kommerzielle Geflügelfreilandhaltungen ausgewählt: 1. Legehennen (n = 4.000), 2. Gänseeltern (n = 1.200), 3. Mastenten (n = 1.200). Diese Bestände werden unter üblichen Bedingungen gehalten, allerdings werden aus diesen Beständen keine Produkte vermarktet. Ein handelsüblicher, EU-weit zugelassener H5-spezifischer Impfstoff wird für Impfkampagnen in diesen Herden nach Herstellerangaben eingesetzt. Ein Teil der Tiere wird nicht vakziniert und dient als Sentinels. Die Überwachung dieser Herden über einen Zeitraum bis zu zwei Jahren umfasst die Messung der Produktivität sowie immunologische, serologische und virologische Parameter.
Die Effizienz der Immunisierung, definiert als Schutz vor der Entwicklung von Krankheit sowie Schutz vor Infektion und Exkretion von Feldvirus, wird in regelmäßigen Intervallen durch Belastungsversuche geimpfter und ungeimpfter Tiere dieser Bestände mit dem im Zuge des H5N1-Ausbruchs auf Rügen isolierten HPAIV kontrolliert. Diese Versuche finden im Hochsicherheitsstalltrakt auf der Insel Riems statt. Die Studie begann im Spätherbst 2006. Erste Ergebnisse werden im Frühjahr 2007 erwartet.

Entwicklung eine Subunit- und inaktivierten Vollvirus-Vakzine zur Immunisierung von Katzen gegen eine Influenza H5N1-Infektion
Vahlenkamp, T.W.*, Giese, M., Harder, T. und Mettenleiter, T.C.

Bei diesem Projekt geht es um eine Pilotstudie, die die Möglichkeiten der Immunisierung von Katzen gegen eine Influenza H5N1 Infektion testen soll.
Bisher wurden zwei experimentelle Studien durchgeführt. Bei der ersten Untersuchung wurde die Virusmenge ermittelt, die bei Katzen eine klinisch manifeste Infektion verursacht. In der zweiten Studie wurden immunisierte Katzen einer Belastungsinfektion unterzogen. Bei beiden Studien wurde der klinische Verlauf der Infektion festgehalten und ebenfalls Proben zur Bestimmung der Virusausscheidung genommen.
Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das von einer erkrankten auf Rügen gefundenen Katze gewonnene Influenza Virus (A/cat/Germany/606/2006,H5N1) nach experimenteller Infektion bei einer Dosis von 10^6 EID_{50} innerhalb von 24 Std. hohes Fieber induziert. Innerhalb von 48 Std. zeigen die Tiere Konjunktivitis, Vorfall des 3. Augenlids, Anorexie und erschwerte Atmung. Die protrahierenden Krankheitssymptome hatten zur Folge, dass die Tiere innerhalb von sieben Tagen starben bzw. euthanasiert werden mussten. Die Untersuchung der Rachentupferproben bei den erkrankten Tieren zeigte, dass infektiöses Influenzavirus ausgeschieden wurde. Die Untersuchung der entsprechenden Proben bei den mit einer geringeren Dosis subklinisch infizierten Tieren steht noch aus.
In einer zweiten Versuchsreihe wurden Katzen mit einem inaktivierten Influenzavirus des Subtyps H5 zweimal im Abstand von vier Wochen immunisiert und vier Wochen nach der zweiten Immunisierung einer Belastungsinfektion mit dem HPAIV A/cat/Germany/606/2006 unterzogen. Im Unterschied zu den nicht immunisierten Kontrolltieren, die alle die oben beschriebenen Symptome entwickelten, erkrankte keines der immunisierten Tiere. Die Untersuchung der Tupferproben bei diesen Tieren ergab, dass lediglich bei einer der fünf immunisierten Katzen infektiöses Virus isoliert werden konnte.
Somit kam es bei den immunisierten Tieren neben dem Ausbleiben von klinischen Symptomen ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Virusausscheidung, was eine Minimierung des potentiellen

Übertragungsrisikos des Virus von Katzen auf den Menschen zur Folge hat und deshalb von erheblichen Interesse für das öffentliche Gesundheitswesen ist.

1.5.1.5 Untersuchungen zur Epidemiologie und Risikobewertung

Serologische Untersuchungen zur Empfänglichkeit von ausgewählten Vogelspezies und Säugetieren in natürlichen Ausbruchsgebieten der aviären Influenza-H5N1-Infektion
Globig, A., Niebuhr, M., Conraths, F.J., Fiedler, W., Harder, T.*, Mettenleiter, T.C., Werner, O. und Beer, M.

Rügen und die vorpommerschen Boddengewässer gelten als eine Drehscheibe des Vogelzugs. Zur Zugzeit werden dort über fünf Millionen Vögel angetroffen, die rasten oder überwintern. Erstmals wurde 2005 eine weite Verbreitung eines hochpathogenen Influenzavirus (HP H5N1 Asia) bei Wildvögeln in Eurasien und Afrika nachgewiesen. Die Erkenntnisse globaler Zugrouten von Langstreckenziehern mit Rügen als möglicher Zwischenstation sowie die Ausbrüche der H5N1-HPAIV-Infektion bei Wildvögeln im Bereich Rügen seit Februar 2006 verdeutlichen die Notwendigkeit, einen Fokus speziell auf diese Region zu richten. Knapp 50 % aller nachgewiesenen Fälle bei Wildvögeln in Deutschland wurden auf der Insel Rügen festgestellt.
Durch die gehäuften Nachweise von HPAIV H5N1 Asia bei toten Wildvögeln in verschiedenen Teilen Rügens im Winter 2006 besteht Anlass zur Annahme, dass dieser Virusstamm in einer unbekannten Population von Wildvögeln verbreitet war bzw. ist. Zur Klärung dieser Frage soll ein breites Artenspektrum wild lebender Tiere in diesem Gebiet mit hoher Infektionsrate untersucht werden, um eine mögliche Etablierung von H5N1 in der Wildvogelpopulation einzuschätzen. Das Projekt soll weiterhin Aufschluss über potenzielle Übertragungswege geben, die bei der Verbreitung und möglichen Etablierung der Infektion eine Rolle spielen.
Hierzu wurden zunächst regionale Infrastrukturen als Grundvoraussetzung zum Fang und zur Beprobung lebender Wildtiere geschaffen, die auch Kooperationen mit den Naturschutzbehörden sowie die Integration ortskundiger Ornithologen bei der Probennahme beinhalteten. Das Spektrum der beprobten Wildtiere umfasste verwilderte Hauskatzen, Nagetiere (Mäuse, Ratten etc.), Raben- und Greifvögel, Singvögel und Limikolen, Möwen, Schwäne und Kormorane. Die Proben wurden virologisch und serologisch auf das Vorkommen von H5N1 und anderer AIV untersucht. Im April 2006 ist die H5N1-Infektion auf Rügen offenbar wieder erloschen. Eine weitergehende Verbreitung des Virus, z. B. innerhalb der Hauskatzenpopulation, konnte auf einer breiteren Basis ausgeschlossen werden. Eine Verbreitung bzw. Etablierung von H5N1 bei gesunden Wildvögeln scheint dementsprechend nach den vorliegenden Untersuchungen nicht stattgefunden zu haben.

Qualitative Risikobewertung zur Einschleppung von hochpathogenem aviärem Influenzavirus H5N1 in Hausgeflügelbestände in Deutschland
Unger, F.*, Staubach, C., Teske, K., Kramer, M., Globig, A., Harder, T., Pötzsch, C.J., Conraths, F.J. und Mettenleiter, T.C.

Die regelmäßige Erstellung von Risikobewertungen zur Einschleppung von hochpathogenem aviärem Influenzavirus (HPAIV) des Subtyps H5N1 wurde fortgeführt, die Risikobewertung bei Bedarf aktualisiert und neue Bewertungen bei Vorliegen einer veränderten Situation erstellt, insbesondere nach dem Auftreten von Fällen in Deutschland ab Februar 2006. In der Risikobewertung wurden die folgenden Expositionen bewertet: legaler und illegaler Handel, Personenverkehr sowie die Rolle von Wildvögeln. Handlungsoptionen waren Teil der Risikobewertung und betrafen vor allem Präventivmaßnahmen zur Verhinderung der Ein- und Weiterverschleppung, seuchenhygienische Maßnahmen im Hausgeflügelsektor sowie die Überwachung von Wildvögeln. Mit dem Nachweis von HPAIV H5N1 in Wildvögeln in Deutschland fand der Risikofaktor Wildvögel (einschließlich Zugvögel) noch mehr Berücksichtigung. Hierzu wurde die Zusammenarbeit mit den Ornithologen weiter intensiviert. Ab August wurden die Ergebnisse des Wildvogelmonitorings in Deutschland, soweit Daten bereits vorhanden waren, zunehmend Bestandteil nachfolgender Bewertungen. Die Risikobewertungen wurden auf den Internetseiten des FLI und des Tierseuchen-Nachrichtensystems (TSN) veröffentlicht. Insgesamt wurden bis zum Jahresende acht Risikobewertungen erstellt.

Epidemiologisches Bulletin: Lagebericht zur aviären Influenza

Unger, F.*, Staubach, C., Teske, K., Teuffert, J., Pötzsch, C.J., Kramer, M. und Conraths, F.J.

Die bereits ab November 2005 begonnene regelmäßige Herausgabe eines Epidemiologischen Bulletins, eines detaillierten Berichts zur Situation und Entwicklung der hochpathogenen aviären Influenza (HPAI) H5N1 bei Tieren in Deutschland (erst ab Februar 2006), Europa und der Welt, wurde 2006 fortgesetzt.
Zusätzlich zu dem Infektionsgeschehen in großen Teilen Asiens und später auch Afrikas kam es im 1. Quartal 2006 zu einer enormen Verbreitung von HPAIV vom Typ H5N1 im europäischen Raum. Allein im Februar wurde HPAIV H5N1 in dreizehn Ländern Europas, einschließlich Deutschland, zum ersten Mal nachgewiesen. Für folgende 23 europäische Länder gab es 2006 Nachweise: Albanien, Bosnien-Herzegowina, Bulgarien, Dänemark, Frankreich, Georgien, Griechenland, Italien, Kroatien, Österreich, Polen, Rumänien, Russland, Schweden, die Schweiz, Serbien und Montenegro, Slowenien, die Slowakei, Tschechien, die Ukraine, Ungarn, das Vereinigte Königreich und Zypern. Darunter waren Infektionen in Hausgeflügelbeständen in Albanien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Rumänien, Russland, Serbien/Montenegro, der Ukraine, Ungarn und der Türkei. Nach der zunächst großräumigen Verbreitung im Frühjahr 2006 gingen die gemeldeten HPAIV H5N1-Infektionen ab Mai 2006 deutlich zurück. Im Juli und August 2006 wurden einzelne Fälle bei Wildvögeln in Spanien (07/2006, Haubentaucher) und Deutschland (08/2006, Trauerschwan, Zoobestand) gemeldet, wobei der Nachweis in Spanien den Erstnachweis für dieses Land darstellte. Darüber hinaus gab es ein über das Jahr verteiltes kontinuierliches Infektionsgeschehen in einigen Ländern Asiens (Indonesien, Vietnam, Thailand) und Afrikas (Ägypten und Nigeria).
Am 15. Februar 2006 wurde HPAIV H5N1 in Deutschland erstmalig festgestellt. Insgesamt wurden Nachweise bei 344 Wildvögeln, drei Katzen und einem Steinmarder in den Bundesländern Baden-Württemberg, Bayern, Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Sachsen und Schleswig-Holstein gemeldet. Am stärksten war dabei das Land Mecklenburg-Vorpommern mit insgesamt 194 Nachweisen, davon 158 auf der Insel Rügen, betroffen. Am 05. April 2006 trat HPAIV H5N1 in Deutschland auch bei Hausgeflügel in einem Bestand im Muldentalkreis des Freistaates Sachsen, Gemeinde Mutzschen auf. Die durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen sprachen für einen indirekten oder direkten Eintrag des HPAI H5N1-Virus über infizierte Wildvögel. Dies wurde auch dadurch unterstrichen, dass das im Bestand nachgewiesene Virus für das Hämagglutinin-Gen eine Homologie von mehr als 99 % mit einem HPAI H5N1-Virus aufwies, das aus einem in Deutschland aufgefundenen Wildvogel isoliert worden war. Der letzte Nachweis von HPAIV H5N1 für Deutschland erfolgte am 03.08.2006 bei einem verendeten Schwan aus dem Bestand des Dresdner Zoos.
Das Epidemiologische Bulletin diente der Information und Unterstützung der Entscheidungsfindung für verschiedene Einrichtungen (z.B. FLI, BMELV, Robert Koch-Institut) und konnte über die Internetseite des Tierseuchen-Nachrichtensystems (TSN) abgerufen werden. Das Epidemiologische Bulletin wurde jeweils bei Änderung der Lage neu erstellt; insgesamt wurden bis Jahresende 41 Ausgaben verfasst.

Nationale Datenbank „Wildvogel-Monitoring zur Aviären Influenza" – National database on Avian Influenza in wild birds

Globig, A., Harder, T., Klöß, D., Kowalczyk, S., Richter, S., Schröder, R., Conraths, F.J., Staubach, C.* und Unger, F.

Als Folge des Auftretens von H5N1 im Februar 2006 bei Wildvögeln in Deutschland wurde das bestehende Wildvogelmonitoring in großem Umfang aktiviert. So wurden alleine von Februar bis April mehr als 50.000 Wildvögel beprobt. Um eine bundesweit einheitliche Auswertung der enormen Zahl an beprobten Wildvögeln zu ermöglichen, wurde auf einer gemeinsamen Sitzung der Länder und des Bundes unter Beteiligung von Ornithologen beschlossen, eine nationale Datenbank zum Wildvogelmonitoring einzurichten. Seit November 2006 steht die Datenbank im Internet für den Probebetrieb zum Erfassen von Daten und seit dem 1. Dezember 2006 auch für den Routinebetrieb zuzüglich Datenauswertung zur Verfügung. In der Datenbank wird jeder tot aufgefundene, erlegte oder lebend beprobte Wildvogel mit seinen spezifischen Kennzeichen (z.B. Spezies, Geschlecht, Alter, Lokalisation) sowie den virologischen und/oder serologischen Laborergebnissen erfasst. Die Dateneingabe erfolgt dezentral in den Untersuchungseinrichtungen und Veterinärämtern der Länder über eine HTML-Maske im Browser oder durch Upload einer Übergabedatei aus den Labormanagementsystemen. Da nicht nur positive Befunde berücksichtigt werden, ergeben sich neue umfangreiche Analysemöglichkeiten (z.B. Stichprobenbeurteilung in Zeit und Raum, Prävalenzschätzungen). Neben den zentral bereitgestellten Auswertungs-

möglichkeiten im Form von Tabellen, Diagrammen und Karten wird durch die automatische Generierung von spezifischen Reporten die Berichterstattung an die Europäische Union erheblich vereinfacht.

Mission zur Stärkung der regionalen Kapazitäten zur Vorbereitung und Kontrolle von Aviärer Influenza in Kenia, Tansania und Uganda (12.02.-10.03.2006)
Unger, F.*

Auftraggeber: Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (BMZ), Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, Deutschland

Das Ziel dieser Beratung was es, die EAC (East African Community) und ihre Partnerstaaten (Uganda, Tansania und Kenia) bei der Entwicklung und Umsetzung der Aviären Influenza (AI)-Bekämpfungsstrategien zu unterstützen. Im Rahmen dieser Beratung wurden dabei sowohl auf EAC- als auch auf Länderebene (National Task Force) die bereits entwickelten Bekämpfungspläne bzw. deren Entwürfe sowie die implementierten Aktivitäten (einschließlich Budget und Gebersituation) diskutiert und hinsichtlich ihrer Angemessenheit eingeschätzt.
Die wichtigsten Empfehlungen umfassten: (a) Umgehende und dauerhafte Harmonisierung der AI Bekämpfungspläne sowohl auf regionaler (EAC, FAO, AU, IBAR) als auch auf nationaler Ebene, (b) Sofortige Fertigstellung der Nationalen Bekämpfungspläne, (c) Vermeidung einer Überbewertung des Humansektors zu Lasten des Veterinärbereiches und (d) Einrichtung einer weitestgehend geberunabhängigen Notfallfinanzierung (einschließlich funktionierender Kompensationsmechanismen). An das Bundesministerium für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit) ging die Empfehlung, der EAC bzw. deren Partnerländern eine mittelfristig orientierte Beratung zu geben als auch über die Bereitstellung von finanziellen Mitteln die Überwachung, Laborkapazität und Training zu fördern. Diese Maßnahmen wurden in neuen Projekten des BMZ berücksichtigt und zum Teil bereits umgesetzt.
Da zum Zeitpunkt des Beginns der Beratung noch keine Fälle von hochpathogenem aviärem Influenzavirus (HPAIV) des Subtyps H5N1 in Deutschland gemeldet worden waren, jedoch erste Nachweise vom afrikanischen Kontinent (Nigeria) vorlagen, ermöglichte die Beratung vor dem Hintergrund des erwarteten Heimzuges von fernziehenden Wildvögeln aus den Migrationskorridoren in Ostafrika nach Deutschland, die tatsächliche AI Situation vor Ort zu ermitteln. Hierbei zeigte sich, dass das Monitoring von Wildvögeln zum Zeitpunkt des Besuches auf vereinzelte, nicht repräsentative Probennahmen in Tansania und Kenia beschränkt war und demnach keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Situation zuließ. Während des Besuches in Uganda kam es zu einer Verdachtsmeldung von Aviärer Influenza (Promed Meldung vom 05.03.2006). Hierbei handelte es sich um eine in der Hauptstadt gelegene Hühnerfarm, auf der es zuvor zu hohen Mortalitäten kam. Sowohl der Besuch des Betriebes als auch eine initiierte Ausbruchsübung zeigten deutlich, dass der Veterinärsektor nur unzureichend auf einen Ausbruch vorbereitet gewesen wäre.

1.5.1.6 Diagnostikentwicklung

Moderne molekulare Diagnostikmethoden: Entwicklung und Einsatz der DNA-Chip-Technologie für eine umfassende Influenzavirus-Diagnostik
Gall, A.*, Hoffmann, B. und Beer, M.

Mittels der DNA-Chip-Technologie können klinische Proben parallel auf eine Vielzahl verschiedener Viren (und andere Pathogene) untersucht werden und die identifizierten Virusisolate außerdem umfassend molekular charakterisiert werden. Im Falle der Influenzavirus-Diagnostik besteht ein massiver Bedarf für die Entwicklung und Anwendung dieser Technologie, da sie das Potential besitzt, molekulardiagnostische Analysen deutlich zu beschleunigen. Damit ermöglicht sie eine ad hoc-Analytik der verschiedenen AIV-Isolate, wie sie im Falle von aktuellen Seuchengeschehen nötig ist.
Die beiden im Rahmen des Projektes beschafften Systeme (NanoChip® 400 System, Nanogen, und ArrayTube System, CLONDIAG Chip Technologies) werden für den Aufbau eines diagnostischen DNA-Chip-Systems zur Identifizierung und Charakterisierung von AIV-Isolaten verwendet. Zunächst wurden etablierte RT *real-time* PCR-Assays zur Detektion von M- und H5-Gen auf das NanoChip® 400 System übertragen, so dass eine Identifizierung von Influenza-A-Virus-Isolaten und dem bedeutenden Subtyp H5 gewährleistet ist. Für die weitere Subtypisierung anhand des Haemagglutinin- (HA 1-16) und Neuraminidase-Gens (NA 1-9) wurden umfangreiche Alignments erstellt, die ca. 2.000 HA-Sequenzen sowie ca. 3.000 NA-Sequenzen umfassen. Für HA abgeleitete Primer und Sonden wurden in eine im

Access-Format eingerichtete Datenbank aufgenommen, die z. Zt. 135 Oligos beinhaltet. Es wurde eine pan-HA-RT-PCR etabliert, deren Produkte mittels Subtyp-spezifischer Sonden auf dem Chip differenziert werden sollen. Das getestete Panel von 53 AIV-Isolaten (aus allen Subtypen außer H14 und H15, die nicht im NRL für AIV vorhanden sind) wurde sicher detektiert. Im Falle von HPAIV wird ein 176 bp großes Produkt amplifiziert, das die Spaltstelle des HA übergreift. Folglich sollte es später möglich sein, hochpathogene und niedrigpathogene AIV H5 und H7 anhand entsprechender Sonden in der Spaltstellenregion zu differenzieren. Anhand von Amplikons der pan-HA-RT-PCR wurde die Funktion Subtyp-spezifischer HA-Sonden überprüft. Weitere Sonden wurden abgeleitet und werden zur Zeit getestet.

Moderne molekulare Diagnostikmethoden: Ultraschnelle Ad-Hoc-Pathotypisierung und Charakterisierung von AIV-Gesamtgenom
Höper, D.*, Hoffmann, B. und Beer, M.

Ziel ist es, ein System für die ultraschnelle Charakterisierung von AIV-Gesamtgenomen zu etablieren. Zu diesem Zweck wurde ein Labor zur Sequenzierung mittels Genome Sequencer 20 (GS20) eingerichtet. Das GS20-System erlaubt die schnelle Sequenzierung kompletter viraler Genome innerhalb von drei bis vier Tagen. Die Vorarbeiten zur Etablierung eines Protokolls für die Generierung doppelsträngiger DNA aus den RNA-Segmenten der AIV-Genome, die das Ausgangsmaterial für die Sequenzierung mit dem GS20 darstellt, wurden aufgenommen.

Herstellung von Referenzmaterialien für die Validierung und Qualitätssicherung der Diagnostik der aviären Influenza
Grund, C.H.*, Häuslaigner, R. und Wäckerlin, R.

Für die AIV-Diagnostik und -Forschung werden umfangreiche Referenzmaterialien benötigt. Dabei ergeben sich insbesondere zwei Schwerpunkte:

- Herstellung von Subtyp-spezifischen Hyperimmunseren für die Differenzierung von AIV-H5-Antigen-Varianten bzw. Präparation verschiedener AIV-H5-Antigene zur Ermittlung der Suptyp-Spezifität von induzierten Antikörpern
- Herstellung von Hyperimmunseren und Standard-Antigenen für die Charakterisierung seltener AIV-Isolate, die im Rahmen des Wildvogelmonitorings gewonnen werden.

Im Rahmen des Projektes wurden bisher Antigene hergestellt, die für die Immunisierung von Tieren verwendet werden können bzw. als Antigen für serologische Tests dienen. Im Vordergrund stand dabei H5N1 (Infl.A/Vietnam/1194/2004, NIBRG 14), das nach Vermehrung im embryonierten Hühnerei mittels Ultrazentrifugation über einen Saccharosegradienten aufgereinigt wurde und als Vollvirusantigen zur Verfügung steht. Außerdem wurden Viruspräparationen eines H5N2-Stammes (A/duck/Potsdam/1402/86) hergestellt, die für die Produktion von Hyperimmunseren bzw. als Antigen bei der Testung von Seren geimpfter Tieren benötigt werden. Des Weiteren wurden die in die Stammsammlung aufgenommenen Stämme H14N5 (A/Mallard/Guriev/263/82) und H16N3 (A/BHG/Sweden/5/99) vermehrt und sowohl Virus-Saatmaterial als auch Arbeitsvirus hergestellt. Von den Viren wurde mittels Beta-Propiolakton (0,05 %, 2 Stunden bei 37° C) ebenfalls inaktiviertes Antigen hergestellt, das zur Inaktivierung bei Erhalt der hämagglutinierenden und antigenen Eigenschaften führt.
Für die Qualitätskontrolle der Referenzseren wurde ein Western-Blot (WB) etabliert. Durch Verwendung eines gegen Enten-Immunglobulin-G gerichteten monoklonalen Antikörpers kann der WB zudem zum Nachweis AIV-spezifischer Antikörper beim Wassergefügel eingesetzt werden. Der Test steht als Bestätigungstest für Seren mit fraglichen ELISA-Ergebnissen zur Verfügung. Erfolgreich wurde der AIV-WB bereits bei Schwanenseren eingesetzt, die in verschiedenen ELISA-Tests variierende Ergebnisse aufwiesen.

1.5.2 Porcine Influenzaviren

Schweineinfluenzavirus (SIV): Virusnachweis nach experimenteller Infektion
Lange, E.*, Starick, E., Klopfleisch, R., Teifke, J.P. und Kaden, V.

In zwei Versuchen an 6-9 Wochen alten Schweinen konnte nach Infektion mit zwei Referenzstämmen vom Subtyp H1N1 das SIV sowohl in Zellkulturen als auch im bebrüteten Hühnerei 1 bis 3 dpi isoliert

werden. In der Zellkultur wurde bei zwei 24 h p.i. getöteten Tieren SIV aus Tonsille, Lunge, Nasenschleimhaut, Trachea und Lungenlymphknoten sowie bei einem Tier aus Mandibularlymphknoten isoliert. Von zwei Schweinen, 48 h p.i. getötet, wurde nur bei einem Tier in den genannten Organen, außer im Mandibularlymphknoten, SIV nachgewiesen. Bei zwei von vier 72 h p.i. getöteten Schweinen wurde Virus in der Tonsille, Lunge, Nasenschleimhaut und Trachea festgestellt. Beide Lymphknoten waren nur bei einem der vier Tiere SIV-positiv. Der Erregernachweis im Nasentupfer gelang nur bei drei von acht infizierten Tieren 1 bzw. 2 dpi. Die Organanreibungen der Lungen der infizierten Schweine wurden auf embryonierte Hühnereier verimpft. Mit diesem Virusisolierungsverfahren waren die Lungen aller 24 und 48 h p.i. getöteten Tiere positiv, 72 h p.i. konnten zwei von vier getöteten Tieren positiv detektiert werden. Die Untersuchungen mittels RT-PCR sind noch nicht abgeschlossen.

Untersuchungen zum Vorkommen von Influenza A-Virusinfektionen bei Wildschweinen in Mecklenburg-Vorpommern

Starick, E., Lange, E. und Kaden, V.*
(in Zusammenarbeit mit Bruer, W. und Krakowski, F. [Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Nordvorpommern])

Ziel der Studie war es, erste Aussagen zur Häufigkeit von Influenza A-Virusinfektionen bei Wildschweinen und damit deren potentielle Rolle als Virusreservoir zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden von 242 überwiegend jungen Tieren aus dem Landkreis Nordvorpommern Lunge und Milz sowie Blutproben entnommen und diese virologisch und serologisch untersucht. Im Hämagglutinationshemmtest reagierten elf Proben positiv, davon neun mit Antigenen des Subtyps H3N2 und zwei gleichzeitig mit Antigen der Subtypen H3N2 und H1N1. Auf Schweinehodenzellen konnte aus zwei Tieren Influenza A-Virus vom Subtyp H3 isoliert werden. Parallel dazu wurde versucht, virale RNA mittels einer RT *real-time* PCR, die einen Teil des für das Matrixprotein kodierenden Gens amplifiziert, nachzuweisen. Dabei kamen von 70 Tieren Lunge und Milz zum Einsatz, von weiteren 105 Tieren wurden nur die Lungen untersucht. Die RNA-Präparation erfolgte überwiegend mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) unter Einbeziehung einer heterologen internen Kontrolle (IC). Ein großer Teil der RT *real-time* PCR Ergebnisse konnte wegen negativer IC-Werte in den Proben nicht gewertet werden; andere Proben ergaben Ergebnisse im fraglichen Bereich des Testes.
Insgesamt jedoch weisen diese ersten Ergebnisse zum Vorkommen von Influenza A-Viren bei Wildschweinen darauf hin, dass Wildschweine keine große Rolle in der Epidemiologie der Influenzaviren bei Wildtieren spielen.

1.6 PARAMYXOVIREN

1.6.1 Virus der Newcastle Disease – aviäres Paramyxovirus 1 (NDV/PMV1)

Die Newcastle-Krankheit ist weltweit verbreitet und bei weit über 200 Vogelarten nachgewiesen. Wirtschaftlich bedeutsam ist sie, da in Hühner- und Putenbeständen große Verluste vorkommen können. In Deutschland besteht Impfpflicht sowohl für große Bestände als auch für kleinere Haltungen.
Der Erreger der Newcastle-Krankheit (NDV; Avian Paramyxovirus 1, APMV-1) wird dem Genus *Avulavirus* der Familie der *Paramyxoviridae* innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* zugeordnet. Das Genom aus einer ca. 15 kb langen, negativ polarisierten, einzelsträngigen RNA kodiert für die sechs Proteine Nukleoprotein (NP), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Fusionsprotein (F), Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die auf Grund ihrer Größe Large Protein (L) genannt wird. Vom P Gen werden zusätzlich durch RNA-Editing die Proteine V und W translatiert. Das für eine effiziente Virusreplikation essentielle V Protein gilt als Interferonantagonist.
Mit der Etablierung eines reversen genetischen Systems für NDV ist es uns seit einigen Jahren möglich, sowohl die Bedeutung bestimmter Sequenzabschnitte zu untersuchen als auch NDV als Vektor für die Expression fremder Proteine zu nutzen.

Entwicklung rekombinanter Vektorimpfstoffe auf der Basis des NDV

Römer-Oberdörfer, A.*, Veits, J. und Wiesner, D.

Nachdem die Gefahr einer Infektion von großen Wirtschaftsgeflügelbeständen mit HPAIV durch Eintrag aus der Wildvogelpopulation auf Grund der bestehenden Seuchensituation größer wird, ist die

Entwicklung moderner Vakzinen gegen z.B. HPAIV vom Subtyp H5 von hoher Priorität (siehe III. Schwerpunktthemen, Institut für Molekularbiologie: Markervakzinen gegen aviäre Influenza). Die Eignung des NDV als Vektor zur Expression von H5 konnte durch Untersuchungen in den Vorjahren bereits gezeigt werden. Nachdem durch Veränderung des Einbauortes für das Fremdgen in das NDV Genom eine deutlich höhere Expression des Fremdproteins erreicht worden war, wurde untersucht, inwieweit die Sequenzunterschiede zwischen zwei verschiedenen H5 Subtypen (H5N2 Italy und H5N1 Asia) Einfluss auf die Schutzwirkung haben. Die Untersuchungen zeigten, dass nach Immunisierung der Tiere mit der Rekombinante, die H5 Italy exprimiert, die Tiere nicht ausreichend gegen H5 Asia geschützt waren. Deshalb wurde ein rekombinantes NDV hergestellt, das das H5 des HPAIV H5N1 Asia exprimiert. Diese Rekombinante vermittelt in SPF Hühnern einen belastbaren Schutz gegenüber einer Infektion mit einer hohen Dosis ($10^6 EID_{50}$/Tier) HPAIV H5N1 (Asia).

Untersuchung der molekularen Grundlage von Pathogenität und Attenuierung des NDV

Untersuchungen des Einflusses ausgewählter Aminosäuren der Oberflächenproteine auf die weitere Attenuierung des NDV Clone 30

E. Topfstedt und A. Römer-Oberdörfer*

Zum Schutz gegen die Newcastle-Krankheit werden derzeit entweder inaktivierte oder Lebendimpfstoffe eingesetzt. Wirtschaftlich interessant wäre ein Impfstoff, der eine *In-ovo*-Vakzination (ioV) erlauben würde, da so eine sehr frühe angeborene und adaptive Immunantwort induziert werden kann. Die Verabreichung über Impfautomaten kann präzise erfolgen und der Impfstress kurz nach dem Schlupf wird dem Tier erspart. Bislang ist es aber noch nicht gelungen, eine effektive ioV gegen NDV einzuführen, da die bisher verwendeten attenuierten Impfstämme wie La Sota, Clone 30 oder auch Hitchner B1 eine zu hohe Virulenz für den Embryo zeigen.
In der Literatur beschriebene, durch Immunselektion erhaltene NDV, die für eine ioV geeignet sein könnten, wiesen drei Aminosäureaustausche in den Oberflächenproteinen auf. Um die Bedeutung dieser Mutationen zu untersuchen, wurden Rekombinanten des NDV Clone 30 hergestellt, bei denen diese Aminosäuren ebenfalls entsprechend verändert waren. Eine Aussage, ob die Mutationen zu einer weiteren Attenuierung des Virus führten, sollte über die Bestimmung der mean death time (MDT) erfolgen. Ein Unterschied zwischen Mutante und Ausgangsvirus war mit dieser Methode aber nicht eindeutig nachweisbar. Daher soll ein noch durchzuführendes *In-ovo*-Experiment genauere Aussagen liefern.

Untersuchungen der zytotoxischen Wirkung von NDV Isolaten auf Krebszelllinien

Kühnel, D., Blohm, U. und Römer-Oberdörfer, A.*

Bereits vor über 40 Jahren wurden die onkolytischen Eigenschaften des NDV erkannt. Seit dieser Zeit erfolgte auch der Einsatz verschiedener NDV-Stämme zur Krebs-Behandlung. Einschränkungen der onkolytischen Effekte durch die Bildung von Patienten-eigenen neutralisierenden Antikörpern erforderten die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, wie z.B. die Einführung einer standardisierten NDV-modifizierten Lebendzell-Tumorvakzine oder die Kombination onkolytischer Virotherapie mit Chemo- oder Bestrahlungstherapie.
Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Pathogenität des NDV und onkolytischer Wirkung wurde die zytotoxische Wirkung ausgewählter NDV-Isolate auf verschiedene Krebszellarten untersucht. Die bereits mit einem kommerziellen Proliferationsassay erhaltenen Ergebnisse wurden durch CSFE-Markierung der Zellen und FACS-Analyse verifiziert. Auch mit dieser Methode konnte für die Zellen HT29 (Colonkarzinom), H460 (Lungenkarzinom) und Panc-1 (Pankreaskarzinom) aus fünf getesteten Isolaten ein Isolat mit verbesserter Wirksamkeit bei der Eliminierung der Krebszellen ermittelt werden. Um den Einfluss der Oberflächenproteine auf die Zytotoxizität zu untersuchen, wurden die Gene der Oberflächenproteine F und HN des Impfvirus Clone 30 gegen die der Oberflächenproteine dieses Isolates ausgetauscht. Die resultierende Rekombinante ist charakterisiert und wird derzeit auf ihre zytotoxischen Eigenschaften für die genannten Krebszellen untersucht.

Etablierung von enzymvermittelten Antikörper-Nachweissystemen für Newcastle Disease beim Wassergeflügel

Grund, C.* und Häuslaigner, R.

Für den Nachweis von NDV-spezifischen Antikörpern bei Hühnern und Puten stehen kommerzielle ELISA Tests zur Verfügung. Für das Wassergeflügel fehlen derartige enzymverstärkte Testsysteme, was

insbesondere serologische Reihenuntersuchungen behindert. In Zusammenarbeit mit der Klinik für Vögel und dem Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München wurde ein monoklonaler Antikörper (mAk), der gegen Immunglobulin G (IgG) der Moschusente (*Cairina moschata)* gerichtet ist, auf seine Eignung als sekundärer Brückenantikörper getestet. Eine breite Kreuzreaktivität mit IgG von verschiedenen Wasservogelarten konnte im Western Blot demonstriert werden. Reaktivität wurde mit IgG von Vertretern der Enten (*Anatinae)* und Gänse *(Anserinae)* nachgewiesen. Dabei wies der mAk sowohl mit dem IgG von Enten aus dem Tribus *Anatini* als auch aus dem Tribus *Cairinini* Reaktivität auf. Auch IgG von verschiedenen Schwanen-Spezies (Subfamilie *Anserinae*) wurden vom mAk detektiert. In der Immunfluoreszenz vermittelte der mAk den Nachweis gebundener APMV-1 spezifischer Antikörper der Moschusente durch FITC-konjugierte Antikörper. Die Eignung des mAk als Brückenantikörper konnte ebenfalls in einem APMV-1-ELISA und APMV-1 Western Blot-Test bestätigt werden. Anhand von Seren APMV-1 geimpfter Moschusenten (*Cairina moschata*) und Gänse (*Anser anser var. dom.*) wurde im Anschluss ein APMV-1 ELISA und Western Blot-Test validiert. Beide Systeme stehen zukünftig für Reihenuntersuchungen von Wassergeflügelseren zur Verfügung. Dabei bietet der ELISA die Möglichkeit, eine große Anzahl von Seren zu testen. Die Spezifität der Reaktion positiver Reagenten kann im Anschluss im Western Blot überprüft werden. Eine Serotypisierung positiver Seren erfolgt mit Hilfe des Hämagglutinations-Hemmungstests.

1.7 PICORNAVIREN

1.7.1 Maul- und Klauenseuchevirus (MKSV)

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine hochkontagiöse, fieberhafte Allgemeinerkrankung der Klauentiere. Das typische klinische Bild der MKS ist geprägt durch die Bildung von Bläschen (Aphthen) und Erosionen an kutanen Schleimhäuten und unbehaarten Teilen der Haut, insbesondere im Bereich des Maules und der Klauen. Die Krankheit verläuft bei erwachsenen Tieren meist nicht letal, führt aber zu einem lang anhaltenden Leistungsabfall. Bei Jungtieren können hohe Verluste durch Schädigung des Herzmuskels auftreten. Obwohl die MKS in Europa in den sechziger bis achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts getilgt wurde, gehört sie wegen ihrer potentiell katastrophalen Auswirkungen auf die Landwirtschaft der Industrie- und fortgeschrittenen Schwellenländer auch heute noch zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Tierseuchen. Die MKS kommt in vielen Ländern Asiens, Afrikas und Südamerikas sowie in der Türkei endemisch vor. Der verheerende Seuchenzug von 2001 im Vereinigten Königreich mit Ausbrüchen auch in Irland, Frankreich und den Niederlanden zeigte erneut, dass die Seuche auch in seit Jahrzehnten MKS-freie Länder jederzeit wieder eingeschleppt werden kann.

Homologe und heterologe Schutzwirkung von MKS-Vakzinen
Brehm, K. und Haas, B.*

Im Rahmen des EU-Projektes FMD_ImproCon werden homologe und heterologe Rinder-Challenge-Experimente mit verschiedenen MKS-Stämmen des Serotyps A nach der Vorschrift der „Europäischen Pharmacopoe“ durchgeführt. Bisher erfolgten Testinfektionen mit den Stämmen A_{22} Irak, A_{24} Cruzeiro, A Iran 96, A Iran 99 und A Egypt 06. Die klinischen Ergebnisse werden mit denen serologischer Tests verglichen, um zu prüfen, inwieweit diese in der Lage sind, die Schutzwirkung von Vakzinen gegen bestimmte Feldstämme vorherzusagen. Im Jahr 2006 wurden fünf Rinder-Challenge-Experimente durchgeführt. Es zeigte sich dabei eine Schutzwirkung auch gegen deutlich heterologe Belastungsinfektionen. Von den Versuchstieren werden Blutproben sowie Nasentupfer-, Speichel- und Rachenschleimproben genommen, um die Infektion und die Wirkung der Impfung nicht nur klinisch, sondern auch mit verschiedenen diagnostischen Verfahren zu verfolgen.

Entwicklung neuartiger Impfstoffe gegen MKSV
Keil, G.*, Haas, B. und Höhle, C.

Der Nachweis von Antikörpern gegen die Nichtstrukturproteine des MKSV erlaubt es, infizierte Tiere in einer geimpften Population mit serologischen Methoden zu erkennen.
Die in letzter Zeit erzielten Verbesserungen der notwendigen diagnostischen Verfahren lassen es wieder wahrscheinlicher werden, dass unter bestimmten Umständen zur Bekämpfung eines Seuchenzuges auch die Impfung eingesetzt wird. Jedoch haben die vorhandenen inaktivierten Impfstoffe eine Reihe von

Nachteilen, weshalb angestrebt wird, sie mittelfristig durch gentechnisch herstellte Impfstoffe abzulösen. Ein Ansatz hierzu sind die so genannten „virus-like particles (VLPs)“ die keine genomische RNA enthalten, aber theoretisch ähnlich immunogen sein sollten wie inaktivierte MKS-Impfstoffe. Um VLPs zu erhalten ist es notwendig, die viralen Strukturproteine VP1 – VP4, die durch proteolytische Spaltung aus dem P1-2A Polyprotein hervorgehen, sowie die 3C-Protease ($3C^{pro}$) gemeinsam zu exprimieren. Dazu wurden rekombinante bovine Herpesviren 1 (BHV-1) generiert, welche die für P1-2A kodierende Region in-frame fusioniert mit den Codons für $3C^{pro}$, als Expressionskassette enthielten. Die Analyse der Prozessierung des P1-2A Polyproteins aus Zellen die mit der Rekombinanten BHV-1/P1-2A/3C infiziert worden waren ergab, dass das P1-2A Polyprotein nicht gespalten wurde. Die Sequenzierung des $3C^{pro}$ ORF aus BHV-1/P1-2A3C zeigte, dass Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums der Protease zu deren Inaktivierung gführt hatten. Dies lässt vermuten dass die Expression aktiver $3C^{pro}$ nicht mit der Vermehrung von BHV-1 kompatibel ist. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde versucht sowohl aktive $3C^{pro}$ als auch die inaktive $3C^{pro}(C^{163}\text{-}G)$ durch BHV-1 zu exprimieren. Dies gelang mit der inaktiven Form, während Versuche die Expressionskassette für die aktive Protease in BHV-1 zu integrieren wiederholt negativ verliefen. Zur Festlegung der weiteren Strategie wird nun geprüft, ob das P1-2A Polyprotein nach Expression durch BHV-1 *in trans* korrekt prozessiert werden kann und ob VLPs gebildet werden. Dazu wurde die $3C^{pro}$ Expressionskassette in rekombinante Baculoviren zur Transduktion von Rinderzellen integriert. Mit der Rekombinanten rMammBac/$3C^{pro}$ transduzierte Zellen spalten P1-2A. Die Generierung von VLPs wird gegenwärtig untersucht.

Vergleichende Untersuchungen von PCR-Protokollen und RNA-Extraktionsverfahren
Durban, M.*, Hoffmann, B. und Haas, B.

Alle Untersuchungen von Proben aus Beständen mit klinischen Symptomen, welche einen MKS-Verdacht begründen sowie alle Proben für serologische Abklärungsuntersuchungen mittels Neutralisationstest müssen weiterhin auch im Krisenfall am FLI erfolgen. Daher muss der mögliche Probendurchsatz, insbesondere für virologische Proben, gesteigert werden. Der erste Schritt hierzu war die Etablierung der *One-Tube-real-time-PCR* für MKSV. Diese *One-Tube-real-time-PCR* wurde erneut im Rahmen eines vom Weltreferenzlabor für MKS durchgeführten Ringtests validiert. Es wurden dabei alle Proben richtig erkannt, auch solche, die in anderen Verfahren Probleme bereiteten.
Um im Falle eines MKS-Ausbruches für die große Zahl der zu erwartenden Proben gerüstet zu sein, wurde im Jahr 2006 ein Verfahren zur automatisierten RNA-Extraktion etabliert. Im Verlauf des Jahres haben sich Varianten des Extraktionsverfahrens bereits bei verschiedenen Ausbrüchen anderer Tierseuchen bewährt, insbesondere bei der aviären Influenza, der klassischen Schweinepest sowie bei der Blauzungenkrankheit. Außerdem wurde eine Vielzahl von Proben aus verschiedenen Tierversuchen aufgearbeitet. Insgesamt wurden im Jahr 2006 über 20.000 Extraktionen in 283 Läufen durchgeführt, wobei BTV mit 8.318 Extraktionen den Hauptanteil ausmachte. Weiterhin wurden die vorhandenen Skripte laufend optimiert. Es ist also gelungen, ein für flüssige Proben gut funktionierendes Extraktionssystem zu etablieren, das sich insbesondere im letzten Quartal des Jahres praktisch bewährt hat. So ist das FLI nun in der Lage ggf. über 1.000 Proben pro Tag zu extrahieren und in der RT *real-time* PCR zu analysieren.

Weitere Projekte

Etablierung eines Bestätigungstests für die MKS-Nichtstrukturprotein-Serologie
Höhle, C., Keil, G.M. und Haas, B.

1.7.2 Picornavirus-bedingte Fischkrankheiten

Überprüfung der Pathogenität eines Picornavirus-Isolates vom Aal
Fichtner, D.*, Granzow, H., Bergmann, S., Schrudde, D. und Teifke, J.P.
(in Zusammenarbeit mit Danner und Caspari sowie Bocklisch, H. [TLLV Bad Langensalza])

2005 konnten aus eingesandten Organen verendeter Aale aus Baden-Württemberg (F15/05) und Thüringen (F28/05) Picornaviren isoliert und elektronenmikroskopisch dargestellt werden.
Mit dem Isolat F15/05 wurde ein Infektionsversuch mit Aalen zur Ermittlung der Pathogenität durchgeführt. Sechzehn Glasaale wurden im Bad mit dem Picornavirus infiziert und anschließend bei 20 °C gehältert. 3-13 Tage p.i. verendeten 43 % der infizierten Aale. Von zehn infizierten Aalen, die

verendet waren oder getötet wurden, konnte das Virus auf Zellkulturen reisoliert werden. In der Kontrollgruppe mit zwölf nicht infizierten Glasaalen verendete ein Fisch wegen einer Verletzung. Bei diesem und weiteren untersuchten Kontrollfischen verlief der Virusnachweis negativ.
Die pathologisch-morphologischen Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen. Histopathologisch fand sich bei einem Teil der verendeten oder getöteten infizierten Fische eine hyalinschollige Degeneration der Skelettmuskulatur mit wenigen eingestreuten mononukleären Entzündungszellen. Ob ein Zusammenhang mit der Infektion besteht, ist durch umfangreiche weitere Kontrolluntersuchungen abzuklären.

Nachweis von Picornaviren in Anzüchtungen von Organhomogenaten akut verendeter Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*)
Granzow, H.* und Fichtner, D.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von zytopathisch veränderten Zellkulturen (FHM Zellen) nach Inokulation mit homogenisiertem Organmaterial (Einsendung des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Hannover, Einsendungs.-Nr. F37/06) akut verendeter Spiegelkarpfen (Cyprinus carpio) führten bereits in unbehandelten Sedimenten zum morphologischen Nachweis von Picornaviren. Bislang ist in der Literatur eine Anzüchtung von Picornaviren aus Gewebe erkrankter Karpfen nicht beschrieben.
Der nach Negativkontrastierung mit PWS (pH 6.0) bestimmte Partikeldurchmesser betrug 28-30 nm.
Parallel dazu durchgeführte Ultradünnschnittuntersuchungen infizierter Zellkulturen (FHM-Zellen, 5 Tage p.i.) ließen im Verlauf der Virusinfektion die für eine Picornavirusreplikation typische Hypertrophie der Zellen und die durch Membranproliferation ausgelösten kleinvakuoligen Veränderungen im Zytoplasma erkennen. Einzelne Viruspartikeln fanden sich verstreut im Zytoplasma. Vereinzelt traten im Zytoplasma zahlreiche, an glatten zellulären Membranen aggregierte Picornaviruspartikel auf. Ähnliche Partikelanordnungen sind für Picornaviren bislang nicht beschrieben worden.

1.8 REOVIREN

1.8.1 Rotaviren

Rotaviren sind weltweit die häufigsten Agenzien von Gastroenteritiden beim Menschen. Nahezu 500.000 Kinder sterben jährlich an dieser Erkrankung. Dabei handelt es sich vorwiegend um Infektionen mit Rotaviren der Gruppe A, während die atypischen Rotaviren (Gruppe B bis G) offensichtlich nur sporadisch auftreten. Über die Verbreitung dieser Typen bei Tieren und deren molekulare Profile ist allerdings bisher wenig bekannt.

Atypische Rotaviren in Tieren – eine Quelle für zoonotisches Potential?
Roth, B.N., Elschner, M. und Otto, P.*

Unsere Untersuchungen belegen, dass sowohl bei Säugerarten (Rind, Schwein) als auch beim Geflügel (Huhn) atypische Rotaviren vorkommen können. Von 1.077 im Zeitraum von 1999 bis 2004 untersuchten an Durchfall erkrankten Tieren konnten wir in acht Fällen atypische Rotaviren mittels PAGE feststellen. In sechs Fällen fanden wir Rotaviren der Gruppe C und in zwei Fällen der Gruppe B. Bei den aviären Rotaviren gelang der Nachweis von Viruspartikeln der Gruppen A, D, F und G. Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Informationen über das genetische Profil von Rotaviren der Gruppen D, F und G vorliegen, ermittelten wir mit einer Sequenz-unabhängigen RT-PCR dsRNA-Klonierungsstrategie die Nukleotidsequenz des VP6-Gens von Rotaviren der Gruppe D, die im Vergleich zu Rotaviren der Gruppe A nur 37,3 % betrug. Auf der Basis dieser genetischen Information entwickelten wir eine RT-PCR zum Nachweis von Rotaviren der Gruppe D. Diese Methode soll als diagnostisches Werkzeug dienen, um weitere Untersuchungen zur Bedeutung atypischer Rotaviren vornehmen zu können.

Weitere Projekte

Untersuchungen zur Bedeutung von aviären Rotaviren beim Runting und Stunting Syndrom (RSS) von Broilerküken
Otto, P., Liebler-Tenorio, E.M., Heller, M., Reetz, J. und Löhren, U.

Morphologische Befunde nach experimenteller Infektion von Broilerküken mit Rotavirus Gruppe A und/oder Gruppe D
Liebler-Tenorio, E.M. und Otto, P.

Pathologische Befunde bei Küken aus europäischen Geflügelbetrieben mit Verdacht auf Malabsorptionssyndrom
Liebler-Tenorio, E.M. und Otto, P.

Pathologie der Jena-Virus-Infektion des Kalbes
Liebler-Tenorio, E.M., Otto, P., Elschner, M. und Berndt, A.

Untersuchungen zum Zelltropismus boviner, caniner und feliner Rotaviren
Giese, M., Wink, K. und Vahlenkamp, T.

1.8.2 Orbiviren

Diagnostik von Orbiviren
Hoffmann, B.*, Riebe, R. und Beer, M.

Für den serologischen Nachweis von Antikörpern gegen das Blauzungenvirus (BTV) stehen geeignete kommerzielle ELISA zur Verfügung. Aufgrund der langen Nachweisbarkeit von BTV-Genomen im Blut erkrankter Tiere sind RT-PCR-Verfahren ebenfalls sehr gut für die Diagnostik geeignet. Da zum Zeitpunkt des BTV-8-Ausbruchs in Deutschland nur ungeeignete RT-PCR-Systeme publiziert waren, wurde am FLI eine RT *real-time* PCR entwickelt, die den aktuell in Zentraleuropa vorkommenden BTV-Stamm sensitiv detektiert. Der neue Test amplifiziert ein 88bp-Fragment des Segments 5 und wurde mit einem internen Kontrollassay zum Nachweis von Inhibitoren kombiniert. Dieser duplex-Assay wurde an die regionalen Untersuchungsämter transferiert und wird dort erfolgreich zur Detektion von BTV8-Genom eingesetzt.
Die BTV-Isolierung erfolgt standardmäßig über die intravenöse Inokulation von embryonierten Hühnereiern mit nachfolgender Passage auf BHK-Zellen. Da diese Prozedur sehr kosten- und zeitintensiv ist und ein besonderes technisches Geschick verlangt, wurde nach geeigneten Alternativen gesucht. Aus der Zellbank konnte eine Zelllinie ermittelt werden, die sehr sensitiv die direkte Anzucht von BTV-8-Viren ermöglichte. Weitere Versuche werden zeigen, ob die Zelllinie zur Virusisolierung aller BTV-Serotypen geeignet ist.

Experimentelle Infektion von Schafen und Rindern mit Blauzungenvirus vom Serotyp 8
Hoffmann, B., Haas, B., König, P., Kalthoff, D., Teifke, J.P. und Beer, M.*
(in Zusammenarbeit mit Darpel, K. [CRL BTV des IAH Pirbright, Vereinigtes Königreich])

Im August 2006 wurde erstmals in Deutschland das Virus der Blauzungenkrankheit (BTV) bei Rindern, Schafen und Wildwiederkäuern nachgewiesen und als Serotyp 8 klassifiziert. Um erste Aussagen zur Pathogenität des Erregers zu erhalten, aber auch zur Gewinnung von Referenzmaterial für die Validierung von BTV-Diagnostika, wurden jeweils drei Kälber sowie drei Schafe mit BTV-haltigem EDTA-Pool-Blut von BTV-8-positiven Tieren inokuliert. Ein weiteres Tier wurde jeweils als negatives Kontroll- und Kontakttier gehalten. Alle Tiere wurden zunächst täglich und dann im Abstand von 2 bis 4 Wochen beprobt (Serum- und EDTA-Blutprobe). Alle drei inokulierten Rinder sowie zwei der drei inokulierten Schafe konnten mit dem BTV-8-positiven EDTA-Blut infiziert werden. In der *real-time* RT-PCR reagierten die Tiere nach ein bis drei Tagen bereits positiv, nach 7 bis 9 Tagen konnten bei den infizierten Tieren BTV-spezifische Antikörper im cELISA nachgewiesen werden. Bei keinem der Rinder wurden nach der Infektion Fieber oder andere, eindeutige klinische Symptome festgestellt. Beide infizierten Schafe zeigten kurzzeitig erhöhte Körpertemperatur, geringgradigen Augen- und Nasenausfluss, injizierte Skleren sowie leichte Hyperämie der Schenkelinnenseite. Die pathologische Untersuchung jeweils eines Rindes sowie eins Schafes ergab zudem punktförmige Blutungen in den Mandibularlymphknoten sowie eine Hyperplasie der Milz. Keines der nicht inokulierten Kontaktiere wurde infiziert. Die Untersuchung von EDTA-Blutproben der beiden noch verbleibenden Rinder in der *real-time* RT-PCR zeigte eindeutig positive Ergebnisse an Tag 180 *post inokulationem*. Beide Tiere werden weiter beobachtet, um die maximale Zeitspanne positiver BTV-8-Genomnachweise zu bestimmen.

1.9 RETROVIREN

Retroviren sind heute bei zahlreichen Säugetieren einschließlich Primaten, Vögeln, Reptilien und Insekten bekannt. Bei Wiederkäuern spielt das zu den *Delta-Retroviren* zählende Bovine Leukosevirus (BLV) als Tierseuchenerreger eine besondere Rolle. Aber auch bei Schafen und Ziegen sind Retrovirusinfektionen verbreitet. So sind auch Schafe, im Gegensatz zu Ziegen, gegenüber einer BLV-Infektion hoch empfänglich.
Die mit dem Erreger der Lungenadenomatose der Schafe (Jaagsiekte-Retrovirus, JSRV) eng verwandten, zu den *Beta-Retroviren* gehörenden Enzootischen Nasentumor Viren ENTV-1 und ENTV-2 besitzen eindeutig onkogene Eigenschaften und rufen Ethmoidalkarzinome bei Schafen bzw. Ziegen hervor.
Innerhalb des Genus *Lentivirus* sind veterinärmedizinisch vor allem das Virus der infektiösen Anämie der Einhufer (EIAV), das Caprine Arthritis Enzephalitis Virus (CAEV) bei Ziegen und das Maedi Visna Virus (MVV) bei Ziegen und Schafen bedeutsam. Lentivirusinfektionen sind im Allgemeinen durch lange Inkubationszeiten gekennzeichnet.

1.9.1 Virus der bovinen enzootischen Leukose (BLV)

Verbesserung der Diagnostik von Infektionen mit dem Bovinen Leukosevirus
Beier, D.* und Vahlenkamp, T.W.

Ein neues BLV-Antikörper-haltiges Referenz-Standardserum E05, welches sich aus 24 Einzelseren aus vier europäischen Ländern und drei verschiedenen BLV-Subtypen zusammensetzt, wurde produziert. Es wurde in einem nationalen Ringtest, an dem auch drei ELISA-Testkithersteller teilnahmen, sowie durch zwei internationale OIE Referenzlabors und ein Collaborating Centre in sechs verschiedenen kommerziellen ELISA-Testsystemen und im Agargel-Immunodiffusionstest geprüft. Im Ergebnis der Untersuchungen ist es dem bisherigen EU Standardserum E4 in der Höhe des Antikörperspiegels überlegen. Das neue Referenzserum ist auch zur Kalibrierung der Milch-ELISA-Tests geeignet. Bei der Herstellung und Prüfung des neuen Standardserums wurden weitestgehend die durch die OIE in den *Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories* vorgegebenen Prüfkriterien berücksichtigt. Das E05 wurde von der OIE Standardkommission zum Einsatz als internationales Referenzserum zur Diagnostik der ERL empfohlen. Der vorhandene Serumpool wurde portioniert, in der Dosierung von jeweils 1 ml lyophilisiert und steht in ausreichender Menge als Prüfserum für Testhersteller, internationale Referenzlabors und nationale Untersuchungseinrichtungen zur Verfügung. Die Lyophilisate unterliegen in regelmäßigen Zeitabschnitten im Referenzlabor einer Qualitätskontrolle.
Die PCR als eine molekularbiologische Methode zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in verschiedenen Matrices (z.B. in Organen, Blut, Zellen, Geweben) wird seit Jahren erfolgreich bei Verdacht auf ERL als env-nested-PCR zusätzlich durchgeführt. Gemeinsam mit dem Fachbereich Veterinär-Biochemie der FU Berlin wurde parallel dazu eine *real-time* PCR etabliert. Es wurden 16 Primer ausgewählt, die im env-Bereich (EMBL-Nr.: K02120) des BLV-Virus liegen. Für jedes mögliche Primerpaar wurde eine PCR durchgeführt, um die Authentizität des Amplifikats (Größe, Sequenz) zu überprüfen. Mittels Gradienten-PCR wurde die optimale Annealing-Temperatur für die sechs Primer-Paare bestimmt, die die stärksten Signale im ersten Ansatz aufwiesen. Die Verwendbarkeit dieser Primer-Kombinationen wurde im *real-time* PCR-Cycler getestet. Nach diesen Etablierungsversuchen wurde DNA aus EDTA-Blut-Proben von Leukose-Versuchs-Rindern des FLI mit der *real-time* PCR untersucht. Als eine der geeignetsten Kombinationen erwies sich für die *real-time* PCR das Primer-Paar forward (5287-5311) und reverse (5594-5570). Die Verwendung dieser Primer-Kombination resultierte in einem spezifischen Produkt, dessen Schmelzpunkt bei 83,75° C liegt. Fast alle DNA-Proben von BLV-positiven Rindern wurden zwischen den C_T-Werten 21-32 in der *real-time* PCR als positiv erkannt. Eine nur sehr schwach positive Probe konnte erst mit der nested *real-time* PCR detektiert werden. Die Verwendung von Verdünnungsreihen zeigte, dass die nested *real-time* PCR um 1.000fach sensitiver als die Durchführung nur eines Durchlaufes einer *real-time* PCR ist.

Pathogenetische Langzeitstudien an natürlich und experimentell mit BLV infizierten Rindern und Schafen
Beier, D.* und Teifke, J.P.

Langzeituntersuchungen zum Auftreten, zur Persistenz und zum möglichen Einfluss von BLV-Subtypen auf die Pathogenese und Diagnostik der enzootischen Rinderleukose wurden fortgeführt. In der

Versuchsrinderherde infizierte sich ein bisher virusfreies Rind mit dem BLV Mischsubtyp, ein weiteres Rind entwickelte eine hochgradige persistierende Lymphozytose.
Mit Hilfe eines Infektionsversuches an Schafen, denen die verschiedensten BLV-Subtypen in kleinster infektiöser Dosis von Spenderrindern verabreicht wurden, wurden die Studien zur Infektiosität und zur Tumorbildung des BLV fortgeführt. Im Berichtszeitraum erkrankte ein Schaf. Das Tier wurde hämatologisch, serologisch auf BLV-Antikörper, mittels PCR auf BLV-Provirus sowie nach Tötung pathologisch-anatomisch und histopathologisch untersucht. Bei der Sektion zeigte es das Bild der tumorösen lymphatischen Leukose mit multizentrischen B-Zelltumoren im Myokard, in Subkutis und Muskulatur des Schultergürtels, periaortal im Bereich des Mediastinums. Insbesondere die Darmbeinlymphknoten waren ebenfalls tumorös entartet. Von allen neoplastisch veränderten Organen wurden Gewebsproben zum Provirusnachweis mittels molekularbiologischer Methoden und als Referenzmaterial für die Diagnostik asserviert.

1.9.2 Virus der Caprinen Arthritis-Encephalitis (CAEV)

Maedi/Visna Virus (MVV) und Virus der Caprinen Arthritis-Encephalitis (CAE)
Beier, D.* und Junghans, D.

Im Berichtszeitraum konzentrierten sich unsere nationalen Untersuchungen auf die Abklärung nicht eindeutiger serologischer Antikörperbefunde aus der Routinediagnostik. Mit Hilfe serologischer Antikörpernachweise wurden in Amtshilfe Untersuchungen bei Verdacht auf Infektionen mit CAEV und MVV durchgeführt.
Ein Sortiment von Referenzseren, die von eigenen Versuchstieren (Schafen und Ziegen) mit bekanntem Krankheitsverlauf gewonnen wurden, steht zur internen Laborkontrolle und Überprüfung der diagnostischen Kits bereit.

1.9.3 Virus der Infektiösen Anämie der Einhufer (EIAV)

Epidemiologische Untersuchungen zum Auftreten der Infektiösen Anämie bei Einhufern in Thüringen
Teuffert, J.* und Kramer, M.

Die ansteckende Blutarmut der Einhufer (Equine infektiöse Anämie; EIA) ist eine systemische Erkrankung der Pferde, Maulesel und -tiere, Esel und Zebras, die mit einer fieberhaften Blutarmut einhergeht und tödlich enden kann. Nachdem seit 2002 in Deutschland kein Fall mehr registriert worden war, kam es in den Monaten September und Oktober 2006 zu insgesamt sieben Seuchenfeststellungen, die in Tabelle 1 kurz dargestellt werden.
Zu den gemeinsam mit den zuständigen Behörden Thüringens durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen und zum Krankheitsgeschehen der EIA in Thüringen wurde ein Bericht erstellt. Darin wird vermutet, dass der Ausbruchsbestand Nr. 1 auch der Indexbestand ist. Nur in diesem Betrieb wurde ein akutes klinisches Geschehen beobachtet, das sich bei einem Großteil der Pferde zeigte und in dessen Folge 44 % der Pferde serokonvertierten.
Auffallend für diesen Bestand war weiterhin der hohe Anteil von Importpferden aus Rumänien und teilweise aus Nordportugal. Rumänien ist der Berichterstattung des OIE/Handystatus II zufolge ein Land, in dem die Infektiöse Anämie bei Einhufern in den letzten Jahren permanent vorkommt. Es ist mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass der Erreger über ein in den Ausbruchsbestand Nr. 1 eingestelltes infiziertes Pferd, möglicherweise mit einer geringen Viruslast, eingeschleppt wurde. Der Infektionszeitpunkt des Indexbestandes ist aufgrund der häufig chronisch verlaufenden Erkrankung weiterhin unbekannt.
Hingegen gab es Hinweise dafür, dass das Infektionsgeschehen innerhalb des Bestandes während der Weideperiode in den Monaten Juni bzw. Juli des Jahres 2006 seinen Ausgang nahm. Dafür sprach, dass nur die Pensionspferde, die ortsgetrennt von den eigenen Pferden des Bestandes weideten, erkrankten und serokonvertierten. Die Analyse der tierärztlichen Behandlungen ließ darauf schließen, dass möglicherweise schon ab Ende Juni 2006 bei einzelnen Pferden Symptome auftraten, die auf das Vorliegen der Infektiösen Anämie hindeuteten. Der Juni und besonders der Juli waren Monate mit extrem hohen Temperaturen, verbunden mit hoher Insektenpopulation. Zwischen den Ausbruchsbeständen 1, 2, 3, 4 und 5 gab es Kontakte, die eine Weiterverbreitung aus dem Ausbruchsbestand Nr. 1 vermuten lassen. Bei

den Beständen 1 und 3 betraf das Tierverbringungen, bei den Beständen 4 und 5 Weidekontakte bzw. indirekte Kontakte bei Ausritten. Keinerlei Hinweise ergaben sich für den Erregereintrag in den Ausbruchsbestand Nr. 6.
Bei der Identitätsprüfung der importierten Pferde betroffener Seuchenbestände ergaben sich teilweise Unstimmigkeiten mit den Einfuhrpapieren. Bezüglich der Equidenpässe wurde deutlich, dass für die im Zeitraum vom 20. November 2001 bis zum 26. Oktober 2005 aus Rumänien über einen bayerischen Händler eingeführten und anschließend in den vermeintlichen Indexbestand Thüringens weiterverkauften Pferde kein Equidenpass mitgeliefert wurde. Auf Antrag des Empfängers wurden diese dann durch die zuständigen thüringischen Behörden ausgestellt.
Schlussfolgernd aus dem Auftreten und dem Verlauf der EIA ist eine Überarbeitung der Einhufer-Blutarmut-Verordnung dringend erforderlich. Darüber hinaus sollte eine Ergänzung der Viehverkehrsverordnung, insbesondere im Hinblick auf die Registrierung und Kennzeichnung von Einhufern, in Erwägung gezogen werden. Erste diesbezügliche Absprachen zwischen BMELV, Thüringischem Ministerium und Landesuntersuchungsamt sowie dem FLI gab es im Dezember 2006.

Tabelle 1: EIA-Ausbruchsbestände im Überblick

Nr. des Ausbruchs-bestandes	Datum Seuchen-feststellung	Bundes-land	Land-kreis	Anzahl Einhufer im Bestand	Davon		Aufhebung der Sperr-maßnahmen
					Verendet	getötet	
1	22.09.06	TH	Weimar Land	27	1	10	18.12.06
2	28.09.06	TH	Weimar Land	2	0	1	22.11.06
3	28.09.06	TH	Ilmkreis	40	0	3	20.11.06
4	09.10.06	TH	Weimar Land	2	0	2	14.10.06
5	13.10.06	TH	Weimar Land	2	0	1	01.12.06
6	24.10.06	TH	Weimar Land	20	0	1	18.12.06
7	09.10.06	SN	Chemnitz Stadt	5	1	2	30.11.06

1.10 RHABDOVIREN

1.10.1 Tollwut-Virus

Die Tollwut, eine der ältesten bekannten Zoonosen, ist eine ernsthafte Gefahr für die Gesundheit des Menschen und der Tiere. Nach Schätzungen der WHO sterben jährlich mehr als 50.000 Menschen vor allem in Asien und Afrika an Tollwut. Tollwutviren gehören zum Genus *Lyssavirus* der Familie *Rhabdoviridae* in der Ordnung der *Mononegavirales*. Aufgrund von Genomsequenzunterschieden werden bislang sieben verschiedene Genotypen von Lyssaviren unterschieden, wobei Fledermäuse Reservoir und Vektor für sechs der sieben beschriebenen Lyssavirus-Genotypen sind. Nur das klassische Tollwutvirus (Genotyp 1) kommt auch bei Wild- und Haustieren vor und ist bis auf Australien und bestimmte Länder mit insularer Lage (Großbritannien und Japan) oder anderen günstigen geographischen Bedingungen (Skandinavien) weltweit verbreitet. Dabei sind je nach geographischer Region verschiedene Vertreter der Familie *Canidae* für die Erhaltung und Ausbreitung der Seuche verantwortlich. Aus epidemiologischer Sicht sind die „sylvatische Tollwut“ (Wildtiertollwut) und die „urbane Tollwut“ (Hundetollwut) zu unterscheiden. In Europa ist der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*), ein Vertreter der Familie *Canidae*, das Hauptreservoir. Tollwutviren werden durch Biss oder direkten Kontakt mit Schleimhäuten übertragen. Die Infektion mit dem neurotropen Tollwutvirus verläuft immer tödlich. Die derzeit laufenden Arbeiten

zur Tollwut konzentrieren sich auf die Tilgung der Seuche in Deutschland und Europa mittels oraler Immunisierung der Füchse sowie auf die Erforschung der Epidemiologie der Fledermaustollwut (Europäische Fledermaustollwutviren 1 [Genotyp 5] und 2 [Genotyp 6]) sowie deren Pathogenität.

Tollwutgeschehen in Deutschland 2006

Müller, T.*, Selhorst, T., Freuling, C., Conraths, F.J. und Geue, L.

Die Intensivierung der Tollwutbekämpfung, insbesondere die konsequente Durchführung einer einheitlichen Impfstrategie in den Ländern Hessen, Rheinland-Pfalz, Baden-Württemberg und Bayern, sowie die enge Zusammenarbeit zwischen den Ländern, dem NRL für Tollwut am FLI sowie BMELV hat sich auch 2006 bewährt. Mit insgesamt drei Tollwutfällen beim Fuchs sowie neun Fällen von Fledermaustollwut (European Bat Lyssavirus Typ 1, EBLV-1) wurde in Deutschland 2006 der niedrigste Stand in der mehr als 50-jährigen Tollwutstatistik erreicht. Die Fuchstollwut nahm somit im Vergleich zum Vorjahr um 90,9% ab, wobei das Seuchengeschehen ausschließlich auf eine einzige Gemeinde in Rheinland-Pfalz begrenzt blieb. Alle drei diagnostizierten Fuchstollwutfälle wurden in der Gemeinde Bodenheim/Nackenheim im Landkreis Mainz-Bingen, ca. 8 km südlich von Mainz, innerhalb der ersten fünf Kalenderwochen (09., 13. Januar sowie 03. Februar 2006) diagnostiziert.
Durch die gezielte Nutzung eines Modells zur prognostischen Bestimmung potentieller Risikogebiete konnte innerhalb nur eines Jahres die Notfallsituation in Rheinland-Pfalz unter Kontrolle gebracht werden. Der Erfolg der Maßnahmen in Rheinland-Pfalz, insbesondere die erhöhte Anzahl von Impfkampagnen in Hochrisikogebieten (6-Wochen-Intervall), könnte Beispielcharakter in Europa für Notfallimpfungen im Falle einer Wiedereinschleppung der Tollwut in bereits freie Gebiete mit erhöhten Fuchsdichten haben.
Aufgrund der Entwicklung der Tollwutsituation konnte die Anzahl der Impfungen auf die turnusmäßigen Kampagnen im Frühjahr und Herbst reduziert werden.
Seit dem 3. Februar 2006 wurde kein weiterer Fall von sylvatischer Tollwut in Deutschland mehr amtlich festgestellt. Die letzten Tollwutfälle in Baden-Württemberg und Hessen traten vor mehr als 22 (28. Februar 2005) bzw. 17 Monaten (27. Juli 2005) auf.
Die positive Entwicklung der Tollwut in den betreffenden Bundesländern beweist, dass Deutschland einen entscheidenden Schritt in Richtung Tilgung der Tollwut unternommen hat.
Das Projekt zur Komplettsequenzierung attenuierter Tollwutvirusimpfstämme und auf dieser Basis in Europa zugelassener Tollwutlebendimpfstoffe für die orale Immunisierung wurde abgeschlossen. Alle attenuierten Tollwutimpfstoffe mit Ausnahme des Vakzinia-Rekombinantenimpfstoffes (VRG) für Zwecke der oralen Immunisierung von Wildtieren stammen von einem Ausgangsvirus, dem Street Alabama Dufferin (1935) ab und besitzen demzufolge eine hohe Sequenzhomologie. Nach mehr als 30 Jahren oraler Immunisierung gibt es jedoch noch immer keine Informationen, wie die einzelnen Impfstoffe genetisch voneinander unterschieden werden können bzw. was die genetische Basis für ihre Attenuierung ist. In einem früheren Projekt zielten wir auf die Komplettsequenzierung des Virusgenoms von vier in Deutschland zugelassenen Tollwutlebendimpfstoffen [Fuchsoral (SAD B19), Rabifox (SAD P5/88), Sanafox (SAD VA1), Rabigen (SAG2)] ab. Durch Einbeziehung weiterer SAD-Impfvirusstämme wie SAD VA1 (1983), SAD Bern (1978), SAD1-3670 Wistar (1965), ERA (1975) sowie eines tschechischen Lebendimpfstoffes (Lysvulpen) konnte zum ersten Mal die Attenuierung von Tollwutlebendimpfstoffen auf genetischer Basis verfolgt werden. Demnach liegen nunmehr die Komplettsequenzen des Virusgenoms von insgesamt neun SAD-Derivaten vor.
Während sich der SAD1-3670 Wistar- und der ERA-Stamm nur durch Einzelmutationen voneinander unterscheiden, weist der originale SAD Bern-Stamm nur noch im N-, P- und M-Protein eine fast 100%-ige Sequenzhomologie zu den beiden Ersteren auf. Die Sequenzierung des SAD1-3670 Wistar- und des originalen SAD Bern-Stamm zeigte, dass es sich bei diesen Stämmen nicht um ‚reine' Virusstämme, sondern um wenigsten zwei verschiedene Virusvarianten handelt. Ein Vergleich der Komplettsequenzen aller neun SAD-Derivate ergab, dass der erste große Attenuierungsschritt mit der Entwicklung des SAD Bern auftrat, der zu 26 Nukleotidveränderungen (15 Aminosäureaustausche) im L-Gen führte, die trotz der weiteren Entwicklung anderer SAD-Impfvirusstämme stabil blieben. Der zweite Attenuierungsschritt passierte zwischen SAD Bern und SAD B19 sowie den heute in Anwendung befindlichen zugelassenen Tollwutlebendimpfstoffen mit beträchtlichen Mutationen vornehmlich im N-, P-, M- (34 Nukleotidmutationen, 16 Aminosäureaustausche) sowie teilweise im G-Gen (1-4 Nukleotidmutationen) und der Leadersequenz (LDR). Die Phylogenetische Analyse ergab überraschende Einblicke in die Abstammung von SAD B19, SAD P5/88, SAD VA1 und SAG2. Zwei kommerzielle Impfvirusköder

enthielten nicht die angegebenen SAD-Stämme. Die Ergebnisse legen eine Sequenzierung von Impfvirusstämmen im Rahmen des Zulassungsverfahrens nahe.
Die diagnostischen Untersuchungen im Rahmen der experimentellen Infektion von *Eptesicus fuscus* mit EBLV-1 wurden abgeschlossen. Im November wurden die experimentellen Untersuchungen zur Pathogenität von Europäischen Fledermausviren (EBLVs) an Fledermäusen fortgeführt. In der zweiten Studie wurden vier Gruppen mit jeweils sieben Wasserfledermäusen (*Myotis daubentonii*) intrazerebral (i.c.), subkutan (s.c.), intranasal (i.n.) oder intramuskulär (i.m.) mit EBLV-2 ($10^{4,9}$ MLD/ml) infiziert. Einer Kontrollgruppe wurde PBS i.m. injiziert. Alle Tiere der i.c.-Gruppe starben innerhalb eines Monats p.i. oder mussten eingeschläfert werden. Bis auf ein Tier aus der s.c.-Gruppe überlebten alle anderen Tiere einen Beobachtungszeitraum von bislang 66 Tagen.
Die aktive Surveillance einer frei lebenden Breitflügelfledermauskolonie mit einer Stärke von ca. 25-35 Tieren wurde fortgesetzt. Im 5. Jahr der Langzeitstudie konnten nur zwei Tiere beprobt werden, darunter ein Wiederfang eines Tieres mit hohen Virus-neutralisierenden Antikörpern (>1:80) gegen EBLV-1. Die Auswertung der bislang vorliegenden Daten zeigt auffällige Übereinstimmung mit den experimentellen Studien mit EBLV-1 bei *Eptesicus fuscus*.

Herausgabe des Rabies Bulletin Europe (RBE)
Freuling, C.* und Kliemt, A.

Das RBE wurde 2006 in einer vierteljährlichen Auflagenstärke von 370-400 Exemplaren weltweit versandt. Am 01. Juli 2006 wurde das neue Web-basierte Tollwutinformationssystem für Europa des WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research am FLI (www.rbe.fli.bund.de) in Betrieb genommen, welches durch die WHO finanziert wurde. Das Tollwutinformationssystem bietet (i) eine interaktive Tollwutdatenbank für Europa, (ii) Online-Publikationen des RBE, (iii) ein Archiv sämtlicher RBE Ausgaben als PDF- und HTML-Version, (iv) die dynamische Darstellung der Tollwutsituation in einzelnen europäischen Ländern in Tabellen, Graphiken und Karten sowie (v) eine Informationsplattform für Neuigkeiten und Konferenzen. Die nutzerfreundlichere Gestaltung der Internetseite führte monatlich zu ca. 22.000-60.000 Zugriffen und ca. 1.200-2.500 Besuchen.

Weitere Projekte

Empfänglichkeit von Schafen gegenüber EBLV-1 und -2
Brookes, S.M., Klopfleisch, R., Müller, T., Healey, D.M., Teifke, J.P., Lange, E., Kliemt, J., Johnson, N., Finnegan, C.J., Johnson, L., Kaden, V., Vos, A. und Fooks, A.R.

Empfänglichkeit von Fledermäusen gegenüber EBLV-1 und -2
Vos, A., Johnson, N., Müller, T., Neubert, L., Kaipf, I., Mansfield, K., Freuling, C., Franka, R., Denzinger, A., Rupprecht, C.E. und Fooks, A.R.

Retrospektive Untersuchungen zum Vorkommen von EBLV-Infektionen bei einheimischen Fledermäusen
Müller, T. und Freuling C. (Zusammenarbeit mit den Fledermausregionalbeauftragten der Bundesländer)

GIS-basierte Auswertung von Flugzeugauslagen bei der oralen Immunisierung
Selhorst, T., Müller, T. und Staubach, C.

Notfallimpfung unter echten Bedingungen – das Beispiel Rheinland-Pfalz
Selhorst, T., Müller, T., Blicke, J., Straubinger, A., Zimmer , K. und Hergarten, G.

Komplettsequenzierung von Europäischen Fledermausvirus Typ 1 und 2
Marston, D.A., McElhinney, L.M., Johnson, N., Müller, T., Conzelmann, K.K., Tordo, N. und Fooks, A.R.

Komplettesequenzierung und Untersuchungen zur genetischen Attenuierung von SAD-Tollwutimpfvirusstämmen
Geue, L., Schares, S., Beckert, A., Kliemt, J., Hoffmann, B., Freuling, C., Zanoni, R., Marston, D., McElhinney, L., Fooks, A.R. und Müller, T.

Kreuzneutralisation von Purified Chick Embryo Cell Culture Vaccine (PCECV) gegen nichtklassische Tollwutvirusstämme
Malerczyk, C., Tordo, N., Kliemt, J., Selhorst, T. und Müller, T.

Untersuchungen zur genetischen Stabilität von SAD B19 nach serieller intrazerebraler Passage in Mäusen und Füchsen
Geue, L., Schares, S., Beckert, A., Kliemt, J., Freuling, C. und Müller, T.

Genotypische Charakterisierung von European Bat Lyssavirus Isolaten aus Deutschland
Freuling, C., Müller, T., Geue, L. Fooks, A.R. und Johnson, N.

Validierung einer Tollwut RT r*eal-time* PCR
Müller, T. und Hoffmann, B.

Entwicklung eines murinen monoklonalen Antikörper-Cocktails zur post-expositionellen Prophylaxe beim Menschen
Müller, T., Rupprecht, C., Wandeler, A., Ertl, H., Dietzschold, B., Kieny, M-P. und Meslin, F.X.

Betreibung eines neuen Web-basierten Tollwutinformationssystems
Freuling, C., Schröder, R., Klöß, D., Kliemt, A. und Müller, T.

Erhebung und Auswertung von Tollwutdaten aus Europa
Freuling, C., Kliemt A. und Müller T.

1.10.2 Rhabdovirus-bedingte Fischkrankheiten: Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN); Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS)

Die viralen Erreger der Infektiösen Hämatopoetischen Nekrose (IHNV), der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV) und der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV) verursachen in der Aquakultur große wirtschaftliche Schäden. Taxonomisch werden diese Erreger der Familie der *Rhabdoviridae* innerhalb der Ordnung der *Mononegavirales* zugeordnet. Das Genom dieser Erreger wurde eingehend charakterisiert. Spezifische monoklonale und polyklonale Antiseren ermöglichen die Diagnose der Erreger. Eine Differenzierung der verschiedenen Isolate erfolgt über Sequenzanalysen. Zunehmend wurden Rhabdoviren aus Aalen isoliert, die virologisch und molekularbiologisch charakterisiert werden.

Reverses genetisches System von VHSV
Schütze, H.* und Hoffmann, B.

Basierend auf den Erkenntnissen, die bei der Etablierung des reversen genetischen Systems für den Erreger der IHNV gewonnen wurden, sollen rekombinante Viren der VHS hergestellt werden. Begonnen wurde mit der Konstruktion der Helferplasmide, die für die Gene N, P und L des VHSV kodieren. Das gesamte Genom der VHSV wurde unter die Kontrolle des T7 RNA Polymerase Promotors kloniert. Mit Hilfe dieser Konstrukte soll nach Transfektion von Zellen mit stabiler Expression der T7 RNA Polymerase der gesamte virale Replikationszyklus des VHSV rekonstituiert werden.

Prüfung einer VHS-Oralvakzine auf Stabilität, Sicherheit und Wirksamkeit
Fichtner, D.* und Bergmann, S.M.
(in Zusammenarbeit mit B. Lange und M. Adelmann [Riemser Arzneimittel AG, Riemserort] und W. Weitschies [Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald])

Auf der Grundlage eines attenuierten VHSV-Stammes wurde eine VHS-Oralvakzine entwickelt. Bei der Herstellung der Vakzine wird das mit Stabilisatoren lyophilisierte Virus mittels Kaltextrusion zu einer festen Arzneiform verarbeitet, die durch ein neuartiges Freisetzungsprinzip im Fisch gekennzeichnet ist. Nach schnellem Zerfall der Arzneiform im Magen der Forellen werden Substanzen freigesetzt, die die Magensäure temporär neutralisieren und so das Vakzinevirus vor dem schädigenden sauren Magenmilieu schützen. Außerdem wird durch den schnellen Zerfall der Arzneiform eine rasche Magenpassage der Vakzine gewährleistet.

Diese Vakzine wurde 2005 erstmalig großtechnisch mit einem maschinellen Extruder produziert und auf Wirksamkeit in einem Tierversuch erfolgreich getestet.
Es wurden weitere Untersuchungen zur Stabilität, Wirksamkeit und Sicherheit der VHS-Oralvakzine durchgeführt. Bei vier hergestellten Versuchschargen mit 1, 5 und 10 % Viruslyophilisat kam es während der Lagerung bei -18° bis -20°C über einen Zeitraum von 16 Monaten nur zu geringen Titerverlusten. Die mehrfache Überdosierung der Charge mit der höchsten Viruskonzentration führte bei den Forellen zu keinen Unverträglichkeitsreaktionen. Bachforellen, Hechte und weitere Wildfische, denen die VHS-Vakzine oral verabreicht wurde oder die mit kurz vorher immunisierten Forellen gehalten wurden, zeigten ebenfalls keine Symptome, die auf eine schädigende Wirkung des Impfstoffes hindeuten könnten.
In einem ersten Feldversuch wurden 6.000 Forellen in einem mit VHSV verseuchten Forellenbestand immunisiert. Der Impfstoff konnte mit geringem Arbeitsaufwand und ohne Stress für die Fische verabreicht werden. Bei den Forellen wurden p.v. keine Abweichungen von der physiologischen Norm festgestellt. Die Felderprobung wird weitergeführt.

Molekulare Epidemiologie der IHN
Enzmann, P.-J.*, Fichtner, D. und Bergmann, S.M.

Auf Grund der bereits erarbeiteten Sequenz-Daten für IHN-Stämme wurde die Datenbank in das EU-Netzwerk EPIZONE aufgenommen und wird hier als Referenz geführt. Auch erste Anfragen aus dem Europäischen Ausland konnten bereits beantwortet werden. Bei einem Seuchenausbruch in einem zugelassenen Gebiet in Süddeutschland konnte die weitere Verschleppung in andere Landkreise eindeutig nachvollzogen werden. Die Virusidentifizierung durch Sequenzierung hat sich damit schon verschiedentlich bewährt. Bei einem weiteren IHN-Ausbruch in einem zweiten zugelassenen Gebiet konnte gezeigt werden, dass der Erregertyp bisher in Deutschland nicht nachgewiesen worden war und die Einschleppung vermutlich aus Frankreich erfolgte. In beiden Fällen wurde deutlich, dass der Handel mit lebenden Fischen noch nicht genügend kontrolliert ist.

1.11 TOGAVIREN

Studien zur Replikation von Sindbis Virus (SINV) und Sleeping Disease Virus (SDV)
Granzow, H.*, Beer, M. und Fichtner, D.

Im Rahmen von Vergleichsuntersuchungen zur Morphogenese von Vertretern der *Togaviridae* wurden mit SINV und SDV (Genus *Alphavirus*) infizierte Zellen (BHK_{21} und CHSE) als Monolayer eingebettet und elektronenmikroskopisch Ultradünnschnitte untersucht. Es existieren derzeit in der Literatur über die Bildungsweise von Alphaviren in Zellkulturen zwei morphologisch unterschiedliche Vorstellungen. Umhüllung präformierter Innenkörper an der Zellmembran (Nukleokapsid gesteuerte Umhüllung) und/oder Umhüllung sich erst unterhalb der Zellmembran formierender Innenkörper (Glykoprotein gesteuerte Umhüllung). In ersten Studien wurden dazu mit SINV infizierte BHK_{21}-Zellkulturen und mit SDV infizierte CHSE-Zellen zu verschiedenen Zeiten post infectionem untersucht.
Deutliche morphologische Veränderungen in der Zellstruktur traten nach SINV-Infektion bereits ab 18 h p.i., nach SDV-Infektion 5 Tage p.i., auf. Diese betrafen vor allem das Auftreten kleiner Membranvesikeln entlang von Vakuolenmembranen (SINV-Infektion), Zellabrundung, Dilatierung von RER und Golgi-Apparat und Akkumulation tubulärer Strukturen unterschiedlicher Länge (Ø 40-50 nm). Ansammlungen präformierter Innenkörper (Ø 30-40 nm) ließen sich an Membranen glattwandiger Vesikeln (SINV-Infektion) und unterhalb der Zellmembran nachweisen. Budding-Prozesse dieser Innenkörper kennzeichneten vor allem die Zelloberfläche. Reifungsstadien im Zytoplasma führten zur Partikelfreisetzung über Exozytose.

1.12 HERPESVIREN

Herpesviren sind in der Natur weit verbreitet. Mehr als 150 distinkte Herpesvirusarten wurden bisher vor allem bei Wirbeltieren, aber auch bei Wirbellosen (Muscheln) gefunden. Eine Reihe von wirtschaftlich bedeutsamen Erkrankungen werden durch Herpesviren verursacht, darunter die Aujeszkysche Krankheit des Schweins (Pseudorabies Virus, PrV), die infektiöse Rhinotracheitis/infektiöse pustulöse Vulvovaginitis des Rindes (bovines Herpesvirus Typ 1, BHV-1), die infektiöse Laryngotracheitis (Virus der infektiösen

Laryngotracheitis, ILTV) und die Mareksche Krankheit des Geflügels (Marek's Disease Virus, MDV) sowie eine erst kürzlich beschriebene Infektion des Koi-Karpfens (Koi-Herpesvirus, KHV). Auf Grund ihrer Bedeutung in der Tierhaltung stellen Herpesviren einen Schwerpunkt der Arbeiten am FLI dar.

1.12.1 Virus der infektiösen Laryngotracheitis der Hühner (ILTV)

Konstruktion und Evaluierung Influenzavirus-Hämagglutinin exprimierender ILTV-Rekombinanten als potentielle Markerimpfstoffe gegen die klassische Geflügelpest
Helferich, D., Veits, J., Teifke, J.P. und Fuchs, W.*

siehe III. Schwerpunktthemen, Institut für Molekularbiologie: Markervakzinen gegen aviäre Influenza

1.12.2 Pseudorabies Virus (PrV)

Das Pseudorabies Virus, der Erreger der Aujeszkyschen Krankheit beim Schwein, stellt das molekularbiologisch wohl am besten charakterisierte tierpathogene Herpesvirus dar. Obwohl die AK in Deutschland seit 2003 getilgt ist, gilt die PrV-Infektion als ein herausragendes Modell für das Verständnis von Herpesvirusinfektionen, insbesondere hinsichtlich der molekularen Vorgänge bei der Virusvermehrung und der Interaktion zwischen Virus und Wirt. Das breite Wirtsspektrum, das neben einem experimentell zugänglichen natürlichen Wirt auch die klassischen Labortiere umfasst, bildet eine wesentliche Grundlage für unsere Untersuchungen, die umfassend von der Strukturaufklärung des Viruspartikels bis zur Molekularbiologie der Infektion reichen.

Quantifizierung viraler Strukturkomponenten
Michael, K., Karger, A., Klupp, B. und Mettenleiter, T.C.*

Das im Vorjahr vorgestellte massenspektrometrische Analyseverfahren zur Quantifizierung von Virusstrukturkomponenten wurde zur Bestimmung der relativen Mengen von PrV-Strukturproteinen in einer größeren Zahl von Deletionsmutanten nunmehr breit angewendet. Ziel der Untersuchungen waren die Funktionsaufklärung einzelner Strukturproteine und die Detektion von Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen einzelnen Strukturkomponenten. Der Schwerpunkt lag hierbei auf den Tegumentproteinen, denen eine Schlüsselrolle bei der Morphogenese zukommt.
In Abwesenheit der Tegumentproteine pUL11 und pUL16 wurde ein bisher unbekanntes N-terminales Fragment des inneren, konservierten Tegumentproteins pUL36 vermehrt eingebaut, das in Wildtyp-Virionen nur in äußerst geringen Mengen vorkommt. Damit könnte pUL11 und pUL16 eine Rolle beim Einbau des essentiellen Tegumentproteins pUL36 zugeschrieben werden. Im Gegensatz dazu ist pUL21 für einen effizienten Einbau der Tegumentproteine pUL46, pUL49 und pUS3 notwendig.
Es wurden auch mehrere zelleigene Proteine als Strukturkomponenten des PrV-Partikels identifiziert, darunter Aktin, HSP27, HSP70, Annexin-A1 und Annexin-A2. Die Bedeutung des Einbaus dieser zellulären Bestandteile in das infektiöse Viruspartikel wird untersucht. Alle Deletionsmutanten, in denen der Aktingehalt im Vergleich zum Wildtyp abwich, zeigten eine gleichsinnige Abweichung auch im Gehalt am viralen Tegumentprotein pUS2, so dass eine Wechselwirkung zwischen diesen beiden Proteinen vermutet wird.
Neben diesen konkreten Ergebnissen konnten allgemeine Prinzipien abgeleitet werden, nach denen PrV-Partikel zusammengesetzt sind:

1. Die Variabilität in der Zusammensetzung nimmt von innen (Kapsid) nach außen (Hülle) zu. Die Zusammensetzung des Kapsides blieb in allen untersuchten Mutanten stabil, d.h. die verschiedenen Kapsidproteine liegen in den stets gleichen stöchiometrischen Verhältnissen vor. Das gilt auch, von der oben genannten Ausnahme abgesehen, für das pUL36, das zur inneren Schicht des Teguments gezählt wird. Im Gegensatz dazu weisen die äußeren Schichten des Teguments (pUS2, pUL16, pUL46, pUL48 und pUL49) z.T. erhebliche Mengenvariationen auf. Die Variation in den Membranproteinen ist mit Ausnahme des Glykoproteins H ebenfalls hoch.
2. Während die Abwesenheit von pUS3, pUL11, pUL16, pUL21 und gE Auswirkungen auf den Einbau einer Reihe anderer Strukturproteine hat, führte das Fehlen von pUL13, pUL41, pUL43 und pUL51 nicht zu veränderten Mengenanteilen anderer Proteine. Einige Strukturproteine, so die oben genannten Kapsidproteine, waren in allen untersuchten Mutanten stabil (pUL18, pUL38, pUL35, pUL17, pUL25 und pUL37), während andere quantitative Veränderungen aufwiesen. Demnach stehen einige Tegumentproteine wie pUl11, pUL16 und pUL21 eher im Zentrum des

Interaktionsnetzwerkes, das das Tegument bildet, während andere wie pUL13, pUL41, pUL43 und pUL51 eher zu den von anderen Bestandteilen rekrutierten Tegumentproteinen gehören dürften oder ausschließlich an redundanten Interaktionen teilhaben.

3. Es gab in den Deletionsmutanten quantitative Abweichungen einzelner Strukturproteine in beide Richtungen, d.h. das Fehlen einzelner Strukturkomponenten kann nicht nur zum entsprechenden Mangel an interagierenden Proteinen führen, sondern auch zum kompensatorischen Einbau anderer Proteine. So wurde Aktin in einigen Deletionsmutanten vermehrt eingebaut, was auf dessen Funktion als universaler Massenkompensator hindeutet.
4. Die Variation der zellkodierten Virionproteine Aktin, HSP70, HSP27, Annexin A1 und A2 in den untersuchten Deletionsmutanten war im Vergleich zu den viruskodierten Proteinen eher hoch.

Protein Profiling Herpesvirus infizierter Zellkulturen
Skiba, M., Karger, A.*, Klupp, B.G. und Mettenleiter, T.C.

Die Infektion einer Wirtszelle durch Alphaherpesviren führt zu einer Reihe tief greifender Veränderungen des Zellstoffwechsels wie zu einer globalen Hemmung der Proteinbiosynthese („virion host cell shutoff", vhs) sowie zur Auslösung von Mechanismen des angeborenen Immunsystems, des programmierten Zelltodes oder der Stressantwort. Eine detaillierte Analyse dieser Reaktionen auf Transkriptionsniveau gelingt mittels Mikro-Array-Analysen. Allerdings sind solche Untersuchungen nicht geeignet, post-transkriptionelle Effekte wie Proteinmodifikationen oder den Proteinkatabolismus zu erfassen. Dazu bedarf es der vergleichenden quantitativen Proteomanalyse infizierter Zellen. Die Grundlage unserer Proteomanalysen bildet die massenspektrometrische Quantifizierung von Proteinen durch Verwendung stabiler, metabolisch eingeführter Isotope (stable isotope labelling with amino acids in cell culture, SILAC). Aufgrund der Mengenlimitationen bei der 2D-gelelektrophoretischen Trennung von Proteingemischen neigt das Verfahren aber zur Überrepräsentation abundanter Proteine. Um auch weniger abundante Proteine zu erfassen, ist es notwendig, die zu untersuchenden Extrakte zu fraktionieren, bevor die Proteine gelelektrophoretisch getrennt werden. Ein solches Fraktionierungs-schema wurde auf der Basis einer sequenziellen Festphasenextraktion durch Affinitätschromatographie entwickelt. Die Darstellung von vier Fraktionen mit jeweils zwischen 10 und 40 % der Gesamtprotein-menge gelingt mit wenig Zeitaufwand, hoher Reproduzierbarkeit und geringer Redundanz. In Kombination mit 2D-Elektrophorese mit geeigneten engen pH-Bereichen („Zoom-Gele") gelingt die Verteilung der Probe auf sieben großformatige 2D-Elektrophoresegele, so dass mehrere Tausend Proteine pro Versuch identifiziert und quantifiziert werden können.

Untersuchungen zur Funktion einzelner PrV-Proteine

Die Arbeitsgruppe hat es sich zum Ziel gesetzt, die molekularen Vorgänge bei der Infektion von Zellen mit PrV möglichst umfassend aufzuklären. Hierfür werden systematisch Deletionsmutanten in einzelnen und/oder mehreren der insgesamt 72 für Proteine kodierenden Gene des PrV hergestellt und detailliert charakterisiert. Eine derartig umfassende Analyse isogener Virusmutanten unter definierten Bedingungen ist bisher einmalig. Die Ergebnisse sind nicht nur für das Verständnis der PrV-Infektion von Bedeutung, sondern erlauben Rückschlüsse auf (molekular)biologische Grundprinzipien einer Herpesvirusinfektion.

1. pUS3
Gentner, S.*, Karger, A., Klupp, B.G. und Mettenleiter, T.C.

Die bei den Alphaherpesviren konservierte Proteinkinase pUS3 ist für die effiziente Freisetzung primär umhüllter Virionen aus dem Kernspalt („nuclear egress") notwendig. Zur Klärung der Frage, ob die Kinaseaktivität oder das Protein mit seiner Struktur als Interaktionspartner für diese Funktion von Bedeutung sind, wurde das katalytische Zentrum durch gezielte Mutagenese inaktiviert. Die Ergebnisse zeigen eindeutig die Bedeutung der Kinase beim „nuclear egress". Bei PrV wird pUS3 überdies in zwei unterschiedlich langen Formen exprimiert: als kürzeres, aber stärker exprimiertes pUS3M, und als etwas längeres, aber nur gering exprimiertes pUS3m. Um die Funktion der beiden verschiedenen Isoformen zu untersuchen, wurden Mutanten hergestellt, die nur eine Form synthetisieren können, sowie eine Mutante, bei der das Start-Methionin für die kurze Form gegen Valin ausgetauscht wurde, was zu stark verminderter Expression von pUS3M führte. Die Analysen zeigten, dass pUS3m offenbar keine wichtige Rolle bei der Virusreplikation spielt, was allerdings auch am geringen Expressionsniveau liegen könnte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Mutanten konstruiert, bei denen pUS3m unter Kontrolle des

immediate-early promoter/enhancer Komplexes des humanen Zytomegalievirus überexprimiert wird. Die Untersuchungen dazu werden derzeit durchgeführt.
Neben der Rolle von pUS3 beim „nuclear egress“ ist es auch bei der Ausbildung zytomorphologischer Veränderungen nach Infektion und bei der Antagonisierung der infektionsbedingten Apoptose von Bedeutung. Es liegt nahe, dass daran zelluläre Substratproteine der viralen Kinase beteiligt sind. Es wurden bisher sowohl zelluläre als auch virale Substrate von alphaherpesviralen pUS3 Kinasen beschrieben, darunter pUL31, pUS9, pUL12, ICP22, HDAC, BAD, Bid und Zytokeratin-17. Zum Nachweis viraler Substrate von PrV pUS3 wurden Zellen infiziert und mit ^{32}P-Phosphorsäure metabolisch markiert. Durch nachfolgende Radioimmunpräzipitation mit monospezifischen Antiseren wurde das pUL31 als Substrat der pUS3-Kinase erkannt. Die Identifizierung weiterer Substrate wird aus der vergleichenden 2D-elektrophoretischen Analyse gereinigter Virionen erwartet. Zum Nachweis von Substraten unter den zellulären Proteinen wurde ein Verfahren zur Isolierung und relativen Quantifizierung von Phosphoproteinen etabliert. Bereits vier Stunden nach Infektion kommt es zu ausgeprägten quantitativen Veränderungen im Phosphoproteom der Wirtszelle, während nicht phosphorylierte Proteine weit geringeren Schwankungen unterliegen.

2. pUL41

Karger, A.*, Klupp, B.G. und Mettenleiter, T.C.

Die Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des „virion host cell shutoff“ Proteins, pUL41, auf der Ebene des Wirtszellproteoms konnten aufgrund einer verbesserten Datenbanklage auf die Rinderzelllinie MDBK (Madin Darby bovine kidney) erweitert werden. Die vorher mit humanen HeLa-Zellen erhaltenen Ergebnisse konnten mit MDBK-Zellen verifiziert werden. So kam es nach Infektion mit PrV zu den gleichen quantitativen Veränderungen in verschiedenen Isoformen des HSP27, wie sie nach Infektion von HeLa-Zellen mit PrV oder dem Herpes Simplex Virus-1 beobachtet worden waren, und zu signifikanten Mengenverschiebungen innerhalb verschiedener Isoformen des Lamin A/C. Dies sind unserer Kenntnis nach die ersten systematischen Versuche zur Charakterisierung von Virusproteinen auf der Ebene des Wirtszellproteoms durch eine tiefer gehende Proteomanalyse.

3. pUL14 und pUL15

Fuchs, W.*, Klupp, B.G., Granzow, H. und Mettenleiter, T.C.

Gegen die UL14 und UL15 Genprodukte des PrV stehen seit kurzem monospezifische Kaninchen-Antiseren zur Verfügung, mit deren Hilfe die beiden Proteine vor allem in den Kernen infizierter oder mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfizierter Zellen nachweisbar sind. Durch cDNA-Klonierung und Sequenzierung viraler Transkripte konnte außerdem erstmals experimentell belegt werden, dass pUL15 bei PrV wie bei anderen Herpesviren von einer gespleißten, d.h. durch Entfernung einer definierten Intron-Sequenz prozessierten mRNA translatiert wird. Zur funktionellen Charakterisierung der beiden Gene wurden durch Mutagenese des als artifizielles Bakterienchromosom (BAC) klonierten PrV-Genoms UL14 bzw. UL15 negative PrV-Mutanten hergestellt. Während nach Infektion nicht komplementierender Zellen mit UL15-negativem PrV keine infektiösen Virusnachkommen entstanden, erwies sich UL14 als nicht essentiell, wenngleich entsprechende Deletionsmutanten stark reduzierte Plaquegrößen und eine deutlich verlangsamte Vermehrung zeigten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass in Abwesenheit von UL15 im Kern infizierter Zellen zwar Kapside gebildet werden, in die jedoch keine virale DNA verpackt wird, und die nachfolgend auch nicht ins Zytoplasma transportiert werden. In Abwesenheit von pUL14 war ebenfalls eine Akkumulation leerer Kapside im Zellkern und darüber hinaus eine Retention umhüllter Viruspartikel im Zytoplasma zu beachten, was jedoch nicht zu einer vollständigen Blockierung der Virusvermehrung führte. Dies deutet darauf hin, dass pUL14 von PrV zur korrekten Faltung, Prozessierung oder intrazellulären Lokalisierung verschiedener bei der Virusmorphogenese relevanter Proteine beitragen könnte, wie dies auch für die homologen UL14-Genprodukte anderer Herpesviren vermutet wird. Bei zahlreichen Herpesviren wurde das hoch konservierte pUL15 als essentielle Untereinheit des Proteinkomplexes identifiziert, der für die korrekte Spaltung und Verpackung der durch die Rolling-Circle-Replikation entstehenden Multimere des viralen DNA-Genoms benötigt wird. Southern-Blot Analysen viraler DNA zeigten, dass auch bei der Replikation von UL15-negativem PrV keine Einzelgenome, sondern lediglich konkatemere Genomketten gebildet werden. Die Spezifität aller beobachteten Replikationsdefekte wurde durch die erfolgreiche Vermehrung der einzelnen Virusmutanten in parallel hergestellten trans-komplementierenden Zelllinien bestätigt, welche das UL14 oder UL15 Protein von PrV konstitutiv exprimierten.

4. pUL36

Böttcher, S.*, Fuchs, W., Karger, A., Klupp, B.G., Michael, K. und Mettenleiter, T.C.

Das bei allen Herpesviren konservierte Tegumentprotein pUL36 nimmt eine zentrale Rolle bei der Morphogenese reifer Virionen ein und ist mit 3.084 Aminosäuren das größte PrV Protein. Obwohl das pUL36 das einzige essentielle Tegumentprotein von PrV ist, ist die beschriebene Interaktion mit dem Tegumentprotein pUL37 zwar an der effizienten Virusreifung beteiligt, jedoch nicht notwendig.
In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der hochkonservierte C-Terminus von pUL36 für die Virusreplikation essentiell ist. Nach einer internen Deletion von 709 Aminosäuren (aa 2087-2795) blieb die Funktion des UL36-Proteins aber erhalten. Um den für die Morphogenese essentiellen Bereich näher einzugrenzen, wurden weitere interne Deletionen im pUL36 vorgenommen und die mutierten Proteine auf ihre Funktionalität getestet. Dabei zeigte sich, dass auch eine Deletion von 895 Aminosäuren im nichtkonservierten Bereich des C-Terminus funktionell toleriert wird, wohingegen die Deletion größerer Bereiche bzw. anderer konservierter Aminosäuren zum Funktionsverlust führte. Mit diesen Ergebnissen konnte so der für die Funktion des pUL36 notwendige Bereich weiter eingegrenzt werden.
Für das pUL36 von HSV-1 wurde auch eine De-Ubiquitinylierungsaktivität im N-Terminus beschrieben, die bei den Herpesviren hochkonserviert ist, deren Bedeutung für die Virusreplikation jedoch noch aufzuklären bleibt. Daher wurde ein bei allen pUL36-Homologen konserviertes Cystein, das für die beschriebene De-Ubiquitinylierungsaktivität notwendig ist, durch ortsgerichtete Mutagenese gegen Serin ausgetauscht sowie der angrenzende, hochkonservierte Bereich von 227 Aminosäuren deletiert. In der Zellkultur zeigte sich eine nur geringe Reduktion der Virustiter und der Plaquegrößen. Nach intranasaler Infektion von Mäusen, unserem Infektionsmodell, waren diese Rekombinanten im Vergleich zum Wildtyp jedoch deutlich weniger virulent und es wurden Überlebenszeiten von bis zu 120 Stunden (Wildtyp ca. 48 h) beobachtet. Die Bedeutung der De-Ubiquitinylierungsaktivität *in vivo* und *in vitro* soll nun näher charakterisiert und eine mögliche Ubiquitinierung viraler Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie geprüft werden.

5. pUL31 und pUL34

Klupp, B.G.*, Keil, G., Granzow, H., Finke, S. und Mettenleiter, T.C.

Der Proteinkomplex aus pUL31 und pUL34 ist für die Freisetzung von Nukleokapsiden aus dem Kern notwendig, wobei beide Proteine strukturelle Komponenten der im Kernspalt lokalisierten primär umhüllten Viruspartikel darstellen, in reifen extrazellulären Virionen aber fehlen. pUL34 stellt dabei ein primäres Hüll- und pUL31 ein primäres Tegumentprotein dar. Um zu klären, ob beide Proteine alleine ausreichen, um einen Knospungsprozess an der inneren Kernmembran in Abwesenheit von Kapsiden zu induzieren, wurde ein Plasmid konstruiert, von dem beide Gene unter Kontrolle des murinen bzw. humanen CMV *immediate-early* Promotors in vergleichbaren Mengen konstitutiv exprimiert werden sollten. Mit diesem Plasmid wurden stabil exprimierende Zelllinien hergestellt. Tatsächlich wurden in diesen Zellen große Einstülpungen der inneren Kernmembran gefunden, die mit Membran-haltigen Vesikeln gefüllt waren. Die Größe und Form dieser Membranvesikel ähnelte dabei primär umhüllten Virionen und sie enthielten pUL31 und pUL34. Dies zeigt, dass beide Proteine nicht nur für die Freisetzung von Kapsiden aus dem Kern benötigt werden, sondern auch für die Bildung primärer Virushüllen ausreichen. Im Weiteren soll nun untersucht werden, welche zellulären Proteine an dieser L-Partikel beteiligt sind und ob diese Vesikel auch mit der äußeren Kernmembran fusionieren können bzw. welche Faktoren für diese Fusion benötigt werden.

6. pUL25

Kuhn, J.*, Fuchs, W., Klupp, B.G. und Mettenleiter, T.C.

Das bei allen Herpesviren konservierte pUL25 ist für die Virusreplikation in der Zellkultur essentiell. Diesem Protein wird vor allem eine Rolle bei der stabilen Verpackung des Virusgenoms in vorgeformte Kapside zugeschrieben. Die funktionelle Charakterisierung einer pUL25 Deletionsmutante von PrV zeigte allerdings, dass virale DNA in Abwesenheit von pUL25 zwar verpackt wird, wenn auch mit geringerer Effizienz, dass aber die DNA-haltigen Kapside nicht an der inneren Kernmembran für den Kernexport knospen können. Immunmarkierungen mit einem pUL25-spezifischen Antiserum zeigten, dass das Protein zwar auf reifen Kapsiden, aber nicht auf unreifen Vorläuferformen vorhanden ist, was die Vermutung nahe legt, dass pUL25 möglicherweise das Signal für die primäre Umhüllung an der inneren

Kernmembran darstellt. Mit Hilfe von Hefe-*Two-Hybrid*- und *GST-pulldown*-Analysen sollen nun virale und zelluläre Interaktionspartner des pUL25 identifiziert werden. Des weiteren sollen über gezielte und zufällige Mutationen funktionelle Domänen im Protein identifiziert werden.

7. Vergleichende Analysen zur Funktion von pUL10 (gM), pUL11 und pUL48

Leege, T.*, Klupp, B.G., Granzow, H. und Fuchs, W.

Das humanpathogene HSV-1 weist hinsichtlich seiner Genomstruktur und seiner Genausstattung große Ähnlichkeiten zu PrV und ILTV auf und wird wie diese der Unterfamilie *Alphaherpesvirinae* zugeordnet. Vergleichende Untersuchungen können deshalb wesentlich zu einem genaueren Verständnis grundlegender Replikations- und Pathogenesemechanismen dieser Virusgruppe beitragen, die sowohl für die Veterinär- als auch für die Humanmedizin von Nutzen sind. Deshalb wurde das Genom des HSV-1 Stammes KOS ähnlich wie vor einigen Jahren das des PrV-Stammes Ka als artifizielles Bakterienchromosom (BAC) kloniert, was eine präzise und effiziente Mutagenese des Virusgenoms in *E. coli* ermöglicht. Die Insertion des bakteriellen Mini F-Plasmidvektors erfolgte im Genlocus des nicht essentiellen und bei vielen anderen Alphaherpesviren gänzlich fehlenden Glykoproteins gJ. Um bei Bedarf dennoch eine schnelle Eliminierung der bakteriellen Fremdsequenzen zu ermöglichen, wurden diese außerdem mit singulären Restriktionsenzymschnittstellen versehen. Mit Hilfe des erhaltenen infektiösen HSV-1 Gesamtklones wurden bislang drei Mutanten hergestellt, in denen die konservierten Gene für das Hüllglykoprotein gM (UL10) bzw. die pUL11- oder pUL48-Tegumentproteine deletiert oder inaktiviert worden waren. Diese drei Gene wurden als erste ausgewählt, weil sie vermutlich für die Virion-Morphogenese im Zytoplasma der Wirtszelle relevant sind, wobei früher beschriebene PrV- und HSV-1 Mutanten zum Teil unterschiedliche Phänotypen zeigten. Während die Deletion von UL10 die Replikation von HSV-1 in Zellkultur nur geringfügig beeinträchtigte, waren in Abwesenheit von UL11 deutlich reduzierte Virustiter und Plaquegrößen zu beobachten und das UL48-negative Virus war in nicht-komplementierenden Zellen praktisch nicht vermehrungsfähig. Deshalb wurden mittlerweile Zelllinien hergestellt, welche pUL11- bzw. pUL48 von HSV-1 konstitutiv exprimierten und in denen die Defekte der entsprechenden Virusmutanten zumindest partiell *in trans* komplementiert werden konnten. Als nächstes sollen nun die Auswirkungen der Mutationen auf die Virusmorphogenese elektronenmikroskopisch untersucht werden. Außerdem soll geprüft werden, ob und wie sich die untersuchten HSV-1 Proteine und die homologen Proteine von PrV gegenseitig komplementieren können. Hierbei kann in vielen Fällen auf bereits vorhandene Virusmutanten und *trans*-komplementierende Kaninchen- (RK13) und Affenzelllinien (Vero) zurückgegriffen werden, in denen beide Viren vermehrungsfähig sind. Die Einbeziehung von Genen des aviären Alphaherpesvirus ILTV in solche Studien gestaltet sich wegen des abweichenden Wirtszell-Spektrums etwas schwieriger, jedoch bestehen auch hier zahlreiche Möglichkeiten, z.B. durch Prüfung einer cis-Komplementation nach dem Austausch homologer Gene im Virusgenom.

Untersuchungen von Proteininteraktionen viraler und zellulärer Genprodukte durch Hefe-2-Hybrid Studien

Krautwald, M.*, Fuchs, W. und Klupp, B.G.

Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems konnten wir bereits verschiedene physikalische Interaktionen zwischen PrV-Proteinen aufzeigen, die bei der primären Umhüllung von Nukleokapsiden an der Kernmembran, deren Tegumentierung und sekundärer Umhüllung im Zytoplasma (siehe Jahresbericht 2002, S. 21-31), oder der Replikation und Verpackung viraler DNA wichtige Rollen spielen (siehe Jahresbericht 2005, S. 132-133). Inzwischen konnten wir drei weitere Proteinwechselwirkungen identifizieren, welche für die letztgenannten Schritte der Virusvermehrung relevant sein dürften. Mit pUL15 als „Köder“ konnten aus einer Expressionsbibliothek des PrV-Genoms jeweils mehrere Klone isoliert werden, die überlappende Fragmente der EP0- und UL28-Gene enthielten. Wurde pUL28 als „Köder“ eingesetzt, konnte dagegen eine starke Interaktion mit dem UL33-Genprodukt nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde auch für HSV-1 gezeigt, dass die homologen pUL15, pUL28 und pUL33 einen Komplex bilden, der für die Spaltung konkatemerer Virus-DNA und deren Verpackung in Kapside benötigt wird. Die biologische Relevanz der Interaktionen des pUL15 und anderer viraler Genprodukte (pUL6, pUL32) mit dem als Transkriptionsregulator beschriebenen EP0 ist dagegen nach wie vor völlig unklar. Dagegen erscheint die nach direkter Koexpression in Hefen gefundene Interaktion der UL25 und UL35 Genprodukte plausibel, da es sich in beiden Fällen um eng mit dem Viruskapsid assoziierte Proteine handelt.

Darüber hinaus wurden schwache Wechselwirkungen des UL35-Kapsidproteins und der von UL36 und UL37 kodierten Tegumentproteine des PrV mit verschiedenen zellulären Genprodukten in einer cDNA-Expressionsbibliothek der Maus gefunden. Besonders auffällig waren dabei die zahlreichen Interaktionen des pUL35 mit verschiedenen Isoformen der zellulären 14-3-3 Proteinfamilie, die auch in umgekehrten Experimenten, also mit den 14-3-3 Proteinen als „Köder", bestätigt werden konnte. Die genannten Proteine sind unter anderem an der Regulation des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Apoptose beteiligt. Die Interaktion viraler Proteine mit solchen Regulatoren könnte somit den Zellstoffwechsel auf eine die Virusvermehrung begünstigende Art beeinflussen. Die molekularen Mechanismen dieser hypothetischen Modulation sind jedoch bislang nicht bekannt.

Studien zum intrazellulären Transport viraler Proteine und Viruspartikel

Krautwald, M.*, Klopfleisch, R., Klupp, B.G. und Fuchs, W.

Da bei HSV-1 gezeigt wurde, dass das UL14 Protein die Kernlokalisation weiterer viraler Genprodukte begünstigt, wurde auch das homologe PrV-Gen mit verschiedenen anderen viralen Genen in Plasmid-transfizierten Zellen koexprimiert, die anschließend durch indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie ausgewertet wurden. Dabei zeigte sich tatsächlich, dass in Anwesenheit von pUL14 deutlich größere Anteile der UL33- und UL35-Genprodukte im Zellkern gefunden werden konnten als in Gegenwart irrelevanter Kontrollproteine. Ein Mangel des für die DNA-Verpackung essentiellen UL33 Proteins im Zellkern könnte die deutlich verlangsamte Replikation UL14-negativer PrV-Mutanten (s.o.) erklären. Ob in den UL14-negativen PrV-Mutanten auch der Einbau des UL35-Kapsidproteins beeinträchtigt ist, bleibt zu prüfen.
Um auch den Einfluss einzelner Proteine auf den intrazellulären Transport von PrV-Partikeln einfach untersuchen zu können, wurden im Verlauf der letzten Jahre verschiedene Gendeletionsmutanten zusätzlich mit dem grün fluoreszierenden Protein (EGFP) markiert, welches als Fusionsprotein mit dem UL35-Kapsidprotein exprimiert wurde. Mit den erhaltenen Doppelmutanten wurden Zellkulturen (RK13) infiziert, nach verschiedenen Zeiten fixiert und durch direkte Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass UL35-EGFP markierte Nukleokapside bereits 3-5 Minuten nach Infektion den Zellkern erreichen, während mit dem Fusionsprotein markierte, neu synthetisierte Kapside nach 2-3 Stunden im Zellkern auftauchen. Bei einer UL48-negativen PrV-Mutante waren diese früheren Schritte des Replikationszyklus nicht signifikant verlangsamt. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen (siehe Jahresbericht 2001, S. 98-99), die bereits darauf hindeuteten, dass die durch das Fehlen des UL48-Tegumentproteins bedingten schweren Defekte nicht in erster Linie auf dessen bekannte Funktion bei der Initiation der viralen Genexpression, sondern vor allem auf eine Störung der Virusmorphogenese im Zytoplasma zurückzuführen sind. Diese ist auch in Abwesenheit des UL37-Tegumentproteins weitgehend blockiert (siehe Jahresbericht 2001, S. 98). Allerdings zeigten die aktuellen Studien, dass bei UL37-negativem PrV auch der Transport von Virionen zum Zellkern und damit der Beginn der Kapsidneusynthese auf über 1 h bzw. 5 h verzögert ist. Zurzeit werden weitere UL35-EGFP exprimierende PrV-Mutanten untersucht und es wird versucht, die erhaltenen Resultate auch durch Videomikroskopie lebender Zellen zu verifizieren.

***In-vitro*- und *In vivo*-Untersuchungen zur Neuroinvasion, Neurovirulenz und Neuropathologie des Pseudorabies Virus**

Maresch, Ch., Teifke, J.P., Klopfleisch, R., Klupp, B.G., Böttcher, S., Krautwald, M., Fuchs, W. und Mettenleiter, T.C.*

Die Infektion peripherer Ganglienzellen setzt einen retrograden Transport des Herpesviruskapsids mit anhängenden Tegumentproteinen zum Zellkern voraus, der vermutlich über zelluläre Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine vermittelt wird. Vom Perikaryon ausgehend werden nach erfolgter Replikation Virusnachkommen im Axon anterograd zurück in die Peripherie oder zentral zu synaptisch verbundenen Neuronen höherer Zentren transportiert. Bisher ist nur sehr wenig über die viralen Strukturelemente bekannt, die den Kontakt zu den zellulären Motorproteinen aufnehmen.
Durch intranasale Infektion von Mäusen wurden im vergangenen Jahr weitere Mutanten des Pseudorabiesvirus (PrV-ΔgNM, PrV-UL3.5G, PrV-ΔUL3.5F, PrV-UL3.5/UL48, PrV-UL21Ba, PrV-gMBa, PrV-ΔgK, PrV-ΔUL25, PrV-ΔUL37, PrV-UL36ΔFse, PrV-UL36ΔXma, PrV-UL36ΔDUB) hinsichtlich ihres Verhaltens *in vivo* untersucht.
So führten auch die wiederholten Infektionsversuche mit PrV-ΔUL37 nicht zu Krankheitssymptomen, was auf einen Verlust der Neuroinvasion im Nervus (N.) trigeminus zurückzuführen ist. Die bilateral mit

5 µl Virus/Zellkulturmedium-Mix (10^6 pfu/ml) intranasal inokulierten Mäuse überlebten länger als vier Wochen, während die entsprechende Mutante in Zellkultur einen zwar eingeschränkten, jedoch kompletten Replikationszyklus zeigte.
Die reduzierte Neurovirulenz von PrV-Mutanten kann auf einem Defekt der transsynaptischen Ausbreitung oder des intraaxonalen Transports, sowohl in antero- als auch in retrograder Richtung beruhen. Die komplexe Innervierung des Nasen-/Rachenraumes der Maus mit sowohl sensiblen als auch motorischen Nerven erschwert aber eine spezifische Untersuchung der Ausbreitungsrichtung. Deshalb wurde das Modell der intrakutanen Infektion in die Flanke der Maus verwendet. Mittels Skarifizierung wurden Mäuse mit 10 µl (10^6 pfu/ml) der PrV-Stämme Kaplan und PrV-Bartha inokuliert und klinisch untersucht. Im Unterschied zur intranasalen Infektion zeigten die Tiere eine um 60 % verlängerte Überlebenszeit. Immunhistologisch konnte das PrV Hauptkapsidprotein in Spinalganglien und grauer Substanz des Lumbalbereichs nachgewiesen werden.

Bekämpfung der Aujeszkyschen Krankheit in Deutschland
Müller, T.*, Teuffert, J., Selhorst, T. und Conraths, F.J.

Die Bundesrepublik Deutschland blieb frei von Aujeszkyscher Krankheit (AK). Die Überwachungsuntersuchungen zur Aufrechterhaltung eines von der AK freien Status in deutschen Schweinebeständen wurden 2006 erstmals nach dem neuen stufenweisen Stichprobenplan durchgeführt. Dennoch gibt es epidemiologische Anhaltspunkte, dass sich Infektionen in Schwarzwildbeständen in Deutschland ausbreiten. In diesem Zusammenhang wurden serologische Daten aus den letzten 20 Jahren aus Sachsen epidemiologisch ausgewertet.
Die Charakterisierung von europäischen PrV-Isolaten vom Schwarzwild mittels Sequenzierung des für das Glykoprotein C kodierenden Genomabschnittes wurde um zwei ungarische PrV Isolate erweitert. Die phylogenetischen Analysen lassen eine eindeutige epidemiologische und geographische Unterscheidung der PrV-Isolate zu.

Weitere Projekte

Vergleichende molekularbiologische Charakterisierung von PrV Isolaten vom Schwarzwild
Müller, T., Klupp, B.G., Conraths, F.J. und Hahn, E.C.

***Real-Time* PCR für die Detektion von Pseudorabies Virus**
Müller, T., Hoffmann, B., Geue, L. und Conraths, F.J.

Analytische Sensitivität von PrV-Antikörper ELISAs
Müller, T., Junghans, D. und Conraths, F.J.

1.12.3 Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV-1)

Untersuchung der molekularen Pathogenese der BHV-1-Infektion mittels BHV-1-BAC
Beer, M.*, Kalthoff, D. und König, P.

Auf der Basis eines BHV-1-BACs (BAC *bacterial artificial chromosome*) des Stammes „Schönböken“ wurden weitere Deletionsmutanten erstellt. Diese wurden einer vollständigen Charakterisierung *in vitro* unterzogen. Anders als bei PrV, aber ähnlich zu dem verwandten EHV-1, konnte gezeigt werden, dass zur korrekten Reifung von gM das Genprodukt von UL49.5 essentiell benötigt wird. Funktionell erweist sich eine UL49.5 deletierte BHV-1-Mutante daher als ebenfalls gM-deletiert. Die Charakterisierung der UL49.5-deletierten Mutante zeigte eine erhebliche Beeinflussung in der Fähigkeit der direkten Ausbreitung von Zelle zu Zelle (*cell-to-cell-spread*). Für eine gM-deletierte Mutante war diese Einschränkung bereits von anderen Autoren beschrieben worden. Der Funktionsverlust des gM in Kombination mit der pUL49.5-Deletion führte zu Plaquegrößen, die im Vergleich zum Wildtypvirus um 64 % reduziert waren. Die Analyse von Kinetikdaten zeigte, dass extrazelluläre Viruspartikel in fast demselben Ausmaß gebildet werden wie vom Wildtypvirus. Dies lässt den Schluss zu, dass dem Heterodimeren-Komplex aus gM/UL49.5 keine essentielle Bedeutung beim *Egress* des Virus zukommt. Damit konnte dem Glykoproteinkomplex gM/pUL49.5 neben dem gE und UL49 eine Funktion beim *cell-to-cell-spread* zugeschrieben werden.

Bei dem Versuch eine UL49.5- und gE-doppelt-deletierte Mutante zu erstellen, zeigte sich, dass diese Deletionskombination als letal anzusehen ist. Von dem einfach gE-deletierten Virus ist bekannt, dass kaum verminderte, extrazelluläre Virustiter erreicht werden. Für BHV-1 wurde damit bestätigt, dass die Proteinkomplexe gE/gI und gM/pUL49.5 ähnliche, wenn auch nicht genaue Funktions-Überlappungen aufweisen. Diese Vermutung war bereits für andere Alphaherpesviren geäußert worden.

Erarbeitung von neuen Strategien zur Immunprophylaxe der BHV-1-Infektion
Beer, M.*, Kalthoff, D. und König, P.

Mit dem BHV-1-Wildtypstamm „2204" wurde ein Challenge-Modell für Infektions- und Vakzineversuche etabliert. Damit werden auch zeitlich versetzt vorgenommene Untersuchungen vergleichbar. Anwendung fand dieses Modell erstmals bei einem Impfversuch mit Fleckviehkälbern. Hier wurde die Wirksamkeit einer neuartigen Vakzineformulierung untersucht. Den Tieren wurde ein Lebendimpfstoff, der durch die Deletion des gE- und eines weiteren Gens attenuiert wurde, in Kombination mit einer als Adjuvant fungierenden Substanz appliziert. Die intramuskuläre Injektion gilt dabei als besonders sicher und unproblematisch. Im Vergleich zu der Tiergruppe, die allein mit dem Lebendimpfstoff immunisiert wurde, zeigten die Tiere, die zusätzlich das Adjuvans verabreicht bekommen hatten, eine verkürzte und verringerte Virusausscheidung nach der Testinfektion. Die neutralisierenden Antikörpertiter waren in der Gruppe der mit Adjuvant vakzinierten Tiere erhöht.

Risikobewertung in der BHV-1-Sanierung am Beispiel ausgewählter Betriebe Niedersachsens
Wiedl, K., Teuffert, J.*, Pötzsch, C. und Conraths, F.J.

In einer zweijährigen Untersuchung (Februar 2004 bis Februar 2006) wurde in fünf ausgewählten Landkreisen in Niedersachsen eine Fall-Kontroll-Studie zu potentiellen Risikofaktoren in der BHV-1-Sanierung durchgeführt. Dazu wurden in einem analytischen Vergleich 42 Kontrollbetriebe und 43 Problembetriebe unter definierten Kriterien ausgewählt und untersucht. Für Problembetriebe war charakteristisch, dass deren Rinderbestände trotz BHV-1-Bekämpfungsmaßnahmen im Zeitraum von 1998 bis zum Zeitpunkt der Betriebsanalyse 2004 aufgrund von Sanierungsproblemen infolge wiederkehrender Neu- bzw. Reinfektionen nicht die BHV-1-freie Anerkennung erlangten. Hingegen waren Kontrollbetriebe solche Betriebe, deren Rinderbestände bei annähernd gleicher Bekämpfungsstrategie wie die Problembetriebe (BHV-1-Untersuchungen, Markerimpfstoffeinsatz in Verbindung mit der Selektion) im Zeitraum von 1998 bis zum Betriebsbesuch 2004 die BHV-1-Freiheit erreichten.
Sowohl in Kontroll- als auch in Problembetrieben wurden im Rahmen der Studie Daten zum Betriebsmanagement sowie zur BHV-1-Bekämpfungs- und Impfstrategie erfasst. Darüber hinaus wurden Milchleistungs- und Fruchtbarkeitsdaten sowohl auf Einzeltier- als auch auf Betriebsebene verglichen. Datenquellen bildeten betriebsbezogene BHV-1-Untersuchungs- und Impflisten, die in den Kreisveterinärämtern vorlagen, sowie Informationen aus dem HIT- (Herdeninformationssystem Tier) und VIT- (Vereinigtes Informationssystem Tierhaltung) Datenbanken. Darüber hinaus erfolgte im Rahmen der Betriebsbesuche ein Interview der Betriebsinhaber mittels eines BHV-1-Fragebogens sowie eine Betriebsbesichtigung.
Die statistische Prüfung ergab für 19 Betriebs- und Managementvariablen signifikante Unterschiede zwischen den Betriebskategorien. In der einzeltierbezogenen Reagentenauswertung zeigten darüber hinaus die Altersklassenverteilung zum Zeitpunkt des ersten positiven Befundes und die Standzeit der Reagenten bis zu ihrem Bestandsabgang statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Problembetrieben.
Insbesondere die Analysen der Impfstrategien, der Anteil ordnungsgemäßer Grundimmunisierungen, die Verteilung des Anteils der Impfungen in vorgegebenen Zeitintervallen, der Anteil ungeimpfter Reagenten und die Reaktionszeit auf das erste positive Testergebnis unterschieden sich zwischen den Kontroll- und Problembetrieben. Milchleistung und Fruchtbarkeitsparameter waren dagegen zwischen den Betriebskategorien nicht statistisch signifikant verschieden. Ebenso konnte kein Unterschied im Leistungsniveau zwischen BHV-1-negativen und BHV-1-positiven Rindern belegt werden.
Zur Verbesserung der BHV-1-Bekämpfung wurden aus den Ergebnissen dieser Studie Empfehlungen zur Impfung, Tierhaltung und Fütterung, zum Tierverkehr und zur Dokumentation abgeleitet und dargestellt.

Stand der Bekämpfung der Bovinen Herpesvirus Typ 1-Infektion (BHV-1) in Deutschland
Teuffert, J.*

Internationale Anerkennung fanden die Bemühungen Deutschlands in der BHV-1-Bekämpfung insofern, als mit der Entscheidung 2004/558/EG der gesamten Bundesrepublik der Artikel-9-Status der Richtlinie 64/432/EWG zuerkannt wurde. Damit verbunden ist die Gewährung zusätzlicher Garantien im Handel mit Rindern. Verpflichtend wurde Deutschland auferlegt, entsprechend der Entscheidung 2003/886/EG jährlich einmal der EU die entsprechenden Angaben gemäß Richtlinie 64/432/EWG des Rates, Anhang IV, zum Stand der BHV-1-Bekämpfung zu übermitteln. Die Daten dafür werden in den Bundesländern mittels BHV-1-Berichtsbogen erhoben und jährlich zum 1. März dem FLI zur Datenanalyse zugestellt.
Per 31.12.2005 zeigte die bundesweite Auswertung für den Milchvieh- und Mutterkuhbereich inklusive deren Nachzucht, dass unter Einbeziehung von 166.972 Beständen folgender Stand in der BHV-1-Sanierung erreicht wurde:

- 77,6 % der Bestände waren BHV-1-frei,
- 15,5 % der Bestände befanden sich in Sanierung und
- 6,9 % der Bestände konnten der Kategorie "sonstige Betriebe" zugeordnet werden.

Für den gleichen Zeitpunkt ergab sich unter Einbeziehung von 11.549.379 Rindern aus dem Milchvieh-, Mutterkuh- und Jungrinderbereich, dass

- 66,4 % der Rinder BHV-1-freien Beständen,
- 29 % der Rinder Sanierungsbeständen und
- 4,6 % der Rinder "sonstigen Beständen" zuzuordnen sind.

Damit erhöhte sich der BHV-1-freie Anteil von Beständen 2005 gegenüber 2004 um 6,8 % und bei den Rindern um 6,2 %. Für den Rindermastbereich ergab die bundesweite Auswertung am Jahresende 2005, dass 19 % der insgesamt 36.120 ausgewerteten Bestände die BHV-1-freie Anerkennung erreichten.
Auf Bundeslandebene waren Bayern, Sachsen-Anhalt und Hessen in der BHV-1-Bekämpfung am weitesten fortgeschritten. Per 31.12.2005 standen dort 94,3/91,5 %; 91,9/84,3 % bzw. 81,2/81,0 % der Bestände/Rinder in der Kategorie "BHV-1-frei", wobei in Sachsen-Anhalt zu diesem Zeitpunkt insgesamt nur noch 3.607 BHV-1-positive Rinder (1,1 %) im Milchvieh-, Mutterkuh- bzw. Jungrinderbereich gezählt wurden.
Schwerpunkte der BHV-1-Bekämpfung bildeten wie bereits in den Vorjahren die Bundesländer Nordrhein-Westfalen, Schleswig-Holstein und Rheinland-Pfalz, in denen 53,5/39,6 %; 53,7/48,9 % bzw. 55,1/48,1 % der Bestände/Rinder (ohne Rindermast) der BHV-1-freien Kategorie zugeordnet werden konnten.

Weitere Projekte

Molekularbiologie des bovinen Herpesvirus Typ 1: BHV-1 Glykoprotein B als Transporter für sekretierte biologisch aktive Proteine
Keil, G. und Höhle, C.

Weiterentwicklung der BHV-1-Markerdiagnostik
Beer, M., Kühn, K. und König, P.

1.12.4 Koi Herpesvirus (KHV, CyHV-3)

Seit einigen Jahren tritt in Zier- und Nutzkarpfenhaltungen weltweit eine häufig tödlich verlaufende Infektionskrankheit auf, als deren Erreger ein bisher unbekanntes Herpesvirus identifiziert wurde. Auf Grund der Morphologie des Viruspartikels sowie Gemeinsamkeiten im Replikationszyklus wurde der Erreger als Herpesvirus klassifiziert und Koi-Herpesvirus (KHV) oder Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) genannt. Bisher sind in Deutschland keine Impfstoffe gegen die KHV-Infektion zugelassen. Im Hinblick auf die Entwicklung sicherer Impfstoffe und zum Studium der Pathogenese der KHV-Infektion wurde damit begonnen, mit gentechnischen Methoden rekombinante Koi-Herpesviren herzustellen.

Virulenzprüfung einer EGFP-exprimierenden Thymidinkinase-negativen KHV-Mutante
Fichtner, D., Bergmann, S., Riechardt, M., Teifke, J.P. und Fuchs, W.*

In einem früheren Projekt gelang es uns, durch homologe Rekombination in Karpfenzellkulturen (CCB) ein rekombinantes KHV-Virus herzustellen, in dessen Genom das Thymidinkinasegen (TK) durch Insertion einer Expressionskassette für das grün fluoreszierende Protein (EGFP) inaktiviert worden war. Dieser Insertionsort wurde gewählt, weil das TK-Gen bei verschiedenen Herpesviren als wichtiger Virulenzfaktor beschrieben wurde, der jedoch für die *In-vitro*-Virusvermehrung nicht essentiell ist. Auch die TK-negative KHV-Mutante zeigte in CCB-Zellen keine signifikant reduzierten Virustiter oder Plaquegrößen.
Bei der Prüfung im Infektionsversuch erwies sich die Mutante jedoch als nach wie vor hoch virulent für spezifisch-pathogenfreie Karpfen mit einer Stückmasse von < 10 g. Nach i.p. Verabreichung von ca. 10^4 plaquebildenden Einheiten (PFU) pro Tier verendeten 100 % der Karpfen. Nach Applikation vergleichbarer Virusdosen durch Immersion betrug die Mortalität immer noch 80 %. Nach Bad-Applikation der Mutante an Karpfen mit einer Stückmasse von etwa 25 g zeigten einige Tiere zwar noch milde Symptome, Todesfälle wurden aber nicht beobachtet. Bei der Sektion zeigten erkrankte Tiere im Einzelfall akute Nekrosen und Blutungen der Kiemenlamellen, meistens waren jedoch keine pathologisch-anatomischen Veränderungen nachweisbar. Durch Illumination von nativen Ganzkörperschnitten der Karpfen unter UV-Licht war bei den mit der EGFP-exprimierenden Mutante infizierten Tieren eine kräftige hellgrüne Autofluoreszenz in multifokaler Verteilung in Haut, Nieren und Darm nachweisbar. Bei histopathologischer Untersuchung der Nieren fanden sich im Interstitium zahlreiche große, zytoplasmareiche polygonale Zellen mit amphophilen intranukleären Einschlusskörperchen, die immunhistologisch positiv für KHV-Antigen reagierten. In verschiedenen Geweben der infizierten Karpfen, die verendet waren oder getötet wurden, konnte das KHV-Genom mittels PCR nachgewiesen werden. Eine Reisolierung der Viren durch Zellkulturpassage gelang jedoch nur in wenigen Fällen.
Von den überlebenden, mit der TK-negativen KHV-Mutante immunisierten Fischen überlebten 92 % eine fünf Wochen nach der Primärapplikation durchgeführte Belastungsinfektion mit dem Wildtypvirus, während in einer Kontrollgruppe mit unbehandelten Karpfen nur 71 % die Infektion überstanden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Deletion des TK-Gens zwar auch bei KHV zu einer erkennbaren Abschwächung der Virulenz führt, entsprechende Virusmutanten aber hinsichtlich ihrer Sicherheit und Wirksamkeit nicht als Lebendvirus-Vakzinen geeignet sein dürften. Allerdings kann die EGFP-Autofluoreszenz der hergestellten KHV-Mutante *In-situ*-Studien zum Verlauf und Organtropismus der Virusinfektion erheblich vereinfachen.

Koi-Herpesvirus (KHV)-Diagnostik
Riechardt, M., Fichtner, D., Schrudde, D., Stumpf, P., Schütze, H. und Bergmann, S.M.*
(in Zusammenarbeit mit Bräuer, G. [Sächsische Tierseuchenkasse Dresden])

Das Koi Herpesvirus (KHV) wird bisher taxonomisch zu den „nicht zugeordneten" Herpesviren gezählt. KHV infiziert Nutz- und Koikarpfen *(Cyprinus carpio),* wobei die Mortalität bei Ausbruch der Krankheit bis zu 100 % betragen kann. In Bundesländern mit großen Nutzkarpfenbeständen (z.B. Sachsen, Bayern, Thüringen und Sachsen-Anhalt) bereitet diese neue Fischseuche seit etwa 2003 zunehmend Probleme.
Unsere Arbeiten konzentrieren sich auf die Ableitung von Primern und Sonden für die konventionelle und die *real-time* PCR und deren Überprüfung auf diagnostische Sensitivität und Spezifität. Die von Gilad et al. (2004) veröffentlichte *real-time* PCR für KHV basiert auf dem selben Fragment wie die momentan diagnostisch verwendete konventionelle PCR. Unter Nutzung der Erfahrungen am FLI soll eine *real-time* PCR entwickelt werden, die auf einem anderen Fragment basiert und mindestens genauso sensitiv und spezifisch ist. Die Vermehrung von KHV in Zellkulturen wurde optimiert. Die Isolierung des KHV aus infizierten Fischen mittels Zellkulturen ist weiterhin wenig effektiv.
Bei einem Tierversuch mit spezifisch-pathogenfreien Spiegelkarpfen wurden mit geringer Infektionsdosis latent bzw. persistent infizierte Fische erzeugt. Die Tiere erkrankten klinisch mit schwach ausgeprägten Symptomen und gesundeten vollständig. Bei Abschluss des Tierversuches vier Wochen p.i. war keine KHV-spezifische Klinik mehr feststellbar. Es wurden Organmaterial und Proben zur nicht-letalen Diagnostik gewonnen. Die vollständige Auswertung des Versuches steht noch aus.

Untersuchungen zum Infektionsspektrum des Koi-Herpesvirus (KHV)
Bergmann, S.M.*, Riechardt, M., Schütze, H., Fischer, U., Schrudde, D., Dauber, M. und Fichtner, D.
(in Zusammenarbeit mit J. Kempter [Universität Szczecin])

Im Rahmen von Untersuchungen zum Infektionsspektrum von KHV wurden Goldfische (*Carassius auratus*), Karauschen (*C. carassius*) und Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) zu latent mit KHV infizierten Karpfen gesetzt. Die Tiere wurden nach vier Wochen gemeinsamer Haltung bei 20 °C geblutet, die Leukozyten separiert und durch Kiemenabstriche beprobt. In dieser Zeit waren keine Symptome einer Erkrankung bei den Fischen festzustellen. Mittels routinemäßig angewandter PCRs, wurde bei keinem Tier in den Leukozyten bzw. den Abstrichen KHV-DNA nachgewiesen. Erst durch Nutzung der nested PCR und Bestätigung der Ergebnisse in der *In-situ*-Hybridisierung und/oder in der Immunfluoreszenz mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern an fixierten Leukozyten konnte KHV-DNA detektiert werden. KHV wurde in Goldfischen, Graskarpfen und Karauschen für mehr als zwei Jahre p.i. gefunden. Diese Fische zeigten niemals Symptome einer KHV-Infektion.

Nachweis von Koi-Herpesvirus (KHV) DNA in Wild- und Zierfischen
Bergmann, S.M.*, Riechardt, M., Schütze, H., Fischer, U., Schrudde, D., Dauber, M. und Fichtner, D.
(in Zusammenarbeit mit J. Kempter, [Universität Szczecin])

Um die Verbreitung des KHV in Gebieten mit KHV-Infektionen beim Karpfen und Koi einzuschätzen, wurden Proben von wild lebenden Karpfen (*C. carpio*), Zährten (*Vimba vimba*), Giebeln (*Carassius auratus gibelio*), Brassen *(Abramis brama*), Rotauge (*Rutilus rutilus*), Welsen (*Silurus glanis*), Schleien (*Tinca tinca*), Silberkarpfen (*Hypophtalmichthys molitrix*), Marmorkarpfen (*Aristichthys nobilis*), Karausche (*Carassius carassius*), Haseln (*Leuciscus leuciscus*) und Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) im nördlichen Polen gewonnen. Primär wurden Organanreibungen mittels PCR und nested PCR untersucht. Nach Sequenzierung der PCR-Produkte wurde KHV vor allem bei Wildkarpfen, Welsen, Marmor-, Silber- und Graskarpfen sowie aus der Hasel nachgewiesen.
Bei Untersuchungen von Zierfischimporten aus asiatischen Gebieten mit KHV-Nachweis bei Nutzfischen wurde KHV bei verschiedenen Varianten vom Goldfisch (Shubunkin, Löwenköpfchen, *C. auratus auratus*), wiederum bei Graskarpfen, bei nicht näher bestimmten Zierwelsen und bei Blaurückenorfen (*Leuciscus idus*) detektiert und mittels Sequenzierung bestätigt.

1.12.5 Aal-Herpesvirus (HVA)

Untersuchung zur Isolierung, Charakterisierung und Attenuierung von *Herpesvirus anguillae* (HVA) und Reovirus isoliert aus Aalen der Aquakultur und der Wildpopulation
Schrudde, D., Bergmann, S.M.*, Fichtner, D., Schütze, H., Granzow, H., Riebe, R. und Dauber, M.
(in Zusammenarbeit mit H. Bentlage [ALBE-Fischfarm, Niedersachsen])

In unserem Labor wurden bislang fünf verschiedene Viren aus Aalen isoliert. Außer einem Birnavirus lagen alle Viren mit HVA assoziiert vor. Um eine deutlichere Abgrenzung im Krankheitsbild zwischen einer Infektion mit HVA bzw. einem Reovirus zu gewinnen, wurden getrennt gehälterte Glasaale mit HVA bzw. mit einer Kombination aus HVA und Reovirus infiziert. Sämtliche diagnostizierte Viren wurden auf der Zelllinie EK-1 (Aalnierenzelle) angezüchtet und in ihrem charakteristischen zytopathischen Effekt (CPE) miteinander verglichen. HVA wurde weiterhin aus verschiedenen Einsendungen isoliert, gereinigt und mittels verschiedener klassischer und molekularbiologischer Methoden näher untersucht. Zum sensitiveren Nachweis und als Bestätigungsreaktion wurde eine nested-PCR etabliert. HVA wurde auf unterschiedlichen Zelllinien und bei verschiedenen Temperaturen attenuiert. Für die Suche nach dem Hauptimmunogen wurden nach dem Homologieprinzip Primer von Hüllglykoprotein-Sequenzen verschiedener aquatischer Herpesviren abgeleitet und in unterschiedlichen PCR-Varianten eingesetzt.

1.13 IRIDOVIREN

Vergleich des Hauptcapsidprotein- (MCP-) Gens verschiedener Ranaviren

Bergmann, S.M.*, Schütze, H., Stumpf, P., Schrudde, D., Dauber, M. und Fichtner, D.

Ranaviren aus Amphibien, Nutz- und Zierfischen wurden in RTG-2- und EPC-Zellen bei 15, 20 und 26 °C vermehrt. Nach der Titerbestimmung wurde für jedes der elf Viren ein optimales Regime der Vermehrung etabliert. Nach Reinigung und Konzentration wurde die DNA mittels DNAzol-Methode (Invitrogen) isoliert und das MCP-Gen mit spezifischen Primern, außer beim Guppy-Virus (GV6) und beim Doktorfisch-Virus (DFV), amplifiziert. Die amplifizierten DNAs konnten nach Sequenzierung direkt verglichen werden. Während sich die Sequenzen der meisten Ranaviren kaum unterschieden (96-100 % Homologie), wurden mit 86 % Homologie gravierende Unterschiede beim Neuseeland-Aal-Iridovirus (NZeel) im Vergleich zu den anderen Viren gefunden. Kaum Unterschiede zeigten sich beim Sequenzvergleich des „European sheatfish virus (ESV)“ und „European catfish virus (ECV)“ mit dem Virus der „Epizootic haematopoietic necrosis (EHNV)“. Die in der Literatur beschriebene 100%ige Homologie vom MCP des ESV und ECV konnte nicht bestätigt werden. Sie waren nur zu 98-99% identisch. Monoklonale Antikörper wurden produziert und getestet.

1.14 PAPILLOMVIREN

Bei Papillomviren, die die Familie *Papillomaviridae* bilden, handelt es sich um 55 bis 60 nm im Durchmesser, unbehüllte, epitheliotrope Viren, die in der Lage sind, benigne Tumoren der Haut und Schleimhaut bei verschiedenen Tierarten, aber auch beim Menschen hervorzurufen. In der Regel bilden sich diese „Warzen“ zurück, ohne zu schweren Beeinträchtigungen des Patienten zu führen, eine maligne Entartung ist jedoch möglich. Der Replikationszyklus der Papillomviren ist eng mit der Differenzierung der Epithelzellen verbunden. Es ist daher nicht ohne weiteres möglich, Papillomviren *in vitro* anzuzüchten. Ein weiteres Charakteristikum der Papillomviren ist ihre strikte Speziesspezifität. Eine gewisse Ausnahme hiervon stellen einige Delta-Papillomviren dar: Bovine Papillomviren (BPV) Typ 1 und 2, die natürlicherweise beim Rind Fibropapillome der Haut verursachen, können Pferde und andere Equiden sowie Hamster experimentell infizieren und dort zu Fibrosarkom-ähnlichen Neoplasien führen. Weitere, jedoch streng wirtsspezifische Papillomviren des Rindes sind die epitheliotropen BPV-3, -4 und -6, die nach der neuen Nomenklatur in die Klasse der Xi-Papillomviren eingruppiert werden. BPV-5 ist in der Lage, am Euter sowohl Fibropapillome als auch Papillome hervorzurufen. Daher wird es, als bislang einziger Vertreter der 3. Klasse, den Epsilon-Papillomviren zugewiesen.

Etablierung und Charakterisierung eines *In-vitro*-Modells zur Untersuchung der Pathogenese des equinen Sarkoids

von Felbert, I., Riebe, R., Lenk, M., Polster, U. und Teifke, J.P.*
(in Zusammenarbeit mit der Riemser Arzneimittel AG, Greifswald-Insel Riems; der Pferdeklinik der Freien Universität Berlin; Tierklinik Hochmoor; Pferdeklinik Demmin; Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza)

Für die Etablierung eines *In-vitro*-Modells wurden 29 equine Sarkoide nach chirurgischer Resektion verwendet. In den Primärkulturen sind die auswachsenden mesenchymalen Zellen spindelförmig elongiert, um den zentral gelegenen Zellkern herum sind sie deutlich plumper und an den Enden fadenförmig ausgezogen. Damit entsprechen sie weitgehend morphologisch der mesenchymalen Tumorkomponente equiner Sarkoide. Zellen, die BPV-DNA enthalten, zeigen ein für Tumorzellen charakteristisches Wachstum. Sie werden nicht durch Zell-zu-Zell-Kontakte in ihrem Wachstum gehemmt und bilden in Folge dessen keinen geordneten Monolayer aus, sondern wachsen ungeordnet (“criss-cross“) oder haufenförmig übereinander (“focus”). Bei den immunzytologischen Untersuchungen für Vimentin zeigten die Tumorzellen nur vereinzelt schwache zytoplasmatische Signale. Im Unterschied dazu reagierten die als Positivkontrolle mitgeführten normalen equinen Fibroblasten zu 100 % positiv.
Die Auswirkung von vier Testsubstanzen (AIM, CHP, PIM, Sanguinarin) auf das Wachstumsverhalten der BPV-DNA-positiven Zellkulturen wurde durch Anwendung eines Proliferationstests untersucht. Es zeigte sich, dass z.B. bei der Sarkoidzellkultur 131/06 eine Wachstumshemmung durch AIM 1, 2 und 3

nachweisbar ist. Bei AIM 1 war das Wachstum bereits nach einer Stunde um 23 % reduziert. Nach 96 h war eine Reduktion des Wachstums um ca. 29 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen feststellbar. Durch Inkubation mit AIM 2 und 3 war nach 96 h die Zellproliferation um ca. 53 % reduziert. Sarkoidzellkulturen zeigten 96 h nach Behandlung mit CHP (Cis-4-Hydroxy-L-Prolin) eine dosisabhängige Wachstumsreduktion zwischen 16 % und 38 %, während die BPV-negative Kontrollzelllinie nur zu maximal 25 % gehemmt wurde.
PIM bewirkte in einer Konzentration von 66 % innerhalb der 1. Stunde im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine bei den Tumorzellen um 70 %, bei den normalen Fibroblasten um 45 % gesteigerte Stoffwechselaktivität. Im Verlauf der nächsten 96 h kam es im Vergleich mit den Kontrollen zu einer Abnahme auf 46 % bzw. 40 %.
Das Benzophenantridinalkaloid Sanguinarin wurde in Konzentrationen von 10 bis 35 µM angewendet. Selektivität lässt sich bei den Sarkoidzellen nachweisen: Nach anfänglicher Steigerung der Proliferation kommt es bei der Sarkoidzellkultur 131/06 ab einer Konzentration von 17,5 µM zu einer Abnahme der Stoffwechselaktivität, bei den normalen Fibroblasten erst ab 25 µM.
AIM 2, CHP und Sanguinarin können demnach bei Sarkoidzellen *in vitro* eine Proliferationshemmung hervorrufen.

1.15 POCKENVIREN

1.15.1 Parapockenviren (PPV)

Rziha, H.-J.*, Schedel, N., Nebrich, S. und Stitz, L.

Der Orf Virusstamm D1701-V (ORFV D1701-V) stellt ein neues, attraktives Vektorsystem zur Herstellung rekombinanter ORFV dar, die in für ORFV nicht-permissiven Wirten eine ausgezeichnete schützende Immunabwehr vermitteln. Um dieses Virusvektorsystem weiter auszubauen, wurde begonnen, rekombinante ORFV herzustellen, die verschiedene Proteine des bovinen Rotavirus (Zusammenarbeit mit T. Vahlenkamp, Insel Riems) sowie das VP60 des RHDV (Zusammenarbeit mit H. Schirrmeier, Insel Riems und G. Meyers, Tübingen) exprimieren.
Daneben wurden folgende Projekte weiter bearbeitet:

Verlauf der ORFV Infektion in nicht-permissiven Zellen

ORFV Vektorvakzine induzieren eine exzellente protektive Immunantwort, ohne dass eine produktive Replikation und Produktion infektiöser ORFV stattfindet. Erste Hinweise auf eine ORFV-spezifische Induktion der Apoptose in murinen Zellen haben sich bestätigt, wobei der endgültige Beweis *in vivo* (nach intramuskulärer Applikation) noch fehlt. Die lokale Fremdgenexpression lässt sich im Muskel bis zu zehn Tage nach der Immunisierung mit abnehmender Stärke nachweisen. Untersuchungen zeigten, dass zu den späteren Zeitpunkten (10 Tage) in den zugehörigen poplitealen Lymphknoten Fremdgen-positive Zellen zu finden sind. Gleichzeitig fanden sich hier immunhistochemisch vermehrt Zellen, die Markerantigene für dendritische Zellen aufwiesen, die in Kontrolltieren nicht auftraten.
Es wurden jetzt Untersuchungen begonnen, eine durch die ORFV-Rekombinanten induzierte angeborene und adaptive Immunantwort durch den Nachweis relevanter Cytokine im Serum und in re-stimulierten Milzzellen näher zu bestimmen. Erste Ergebnisse deuten weiterhin auf eine ORFV-vermittelte Stimulierung von NK-Zellen bereits 24 Stunden nach der Immunisierung hin.

Charakterisierung der ANK-Gene des ORFV

Die kürzlich beschriebenen ANK-Gene des ORFV (Ank-1 bis -3) kodieren für Proteine, die bis zu neun sich wiederholende Aminosäuremotive besitzen (Ankyrin repeats). Diese ANK-Motive sind weit verbreitet und essentiell für die verschiedensten Protein-Protein Wechselwirkungen bei der Regulation von Transkription, Apoptose, Immunantwort, Zellzyklus oder Proteintransport. Bisherige Ergebnisse zeigten nach Expression der verschiedenen Ank-Gen-EGFP Fusionsproteine in Zellen (Zusammenarbeit mit K. Lacek, B. Szewczyk, Universität Gdansk), dass ein Ank-Genprodukt mit den Mitochondrien assoziiert, während ein zweites Ank-Protein des ORFV im Zellkern mit PML/ND10 Kernmatrixproteinen kolokalisiert. Derzeit werden verschiedenste Deletionskonstrukte beider Ank Gene hergestellt, um für die Kolokalisation verantwortliche Domänen der ORFV Ank-Proteine zu finden.

1.16 NICHT KLASSIFIZIERTE VIREN

Charakterisierung des White bream virus WBV DF24/00

Schütze, H.*, Ulferts, R., Schelle, B. Bayer, S. Granzow, H., Hoffmann, B., Mettenleiter, T.C. und Ziebuhr, J.

Im Rahmen eines vom Bundesland Sachsen-Anhalt durchgeführten Monitoringprogrammes bei Fischen wurde aus den Organen einer klinisch unauffälligen Güster (*Blicca bjoerkna* L., *Teleostei*, Ordnung *Cypriniformes*) ein zythopathogenes Virus (White bream Virus: WBV DF24/00) isoliert. Die Analyse der Nukleotidsequenz, Genomorganisation und Expression des aus 26.6 kb bestehenden Genoms ergibt eine phylogenetische Verwandtschaft des WBV mit den Vertretern der *Nidovirales*. Die Ordnung der *Nidovirales* umfasst die Spezies der Familien *Coronaviridae* (Genera *Coronavirus* und *Torovirus*), *Roniviridae* (Genus *Okavirus*) sowie *Arteriviridae* (Genus *Arterivirus*). Das Genom des WBV DF24/00 wurde identifiziert und charakterisiert. Es besteht aus einzelsträngiger RNA positiver Polarität und hat eine Größe von 26.6 kb. Das polycistronische Genom kodiert für fünf offene Leserahmen (open reading frame ORF): ORF1a, -1b, -2, -3 und –4. In virusinfizierten Zellen wurden drei subgenomische RNA identifiziert. Diese kodieren für die Strukturproteine S, M und N. Die aus 42 Nukleotiden bestehende Leadersequenz der subgenomischen RNA ist identisch mit dem 5' Terminus der genomischen RNA. Stromabwärts der Leadersequenz und stromaufwärts der Strukturprotein-Gene befindet sich eine konservierte Sequenz aus neun Nukleotiden: CA(G/A)CACUAC. Diese ist vermutlich für die Regulation der Transkription verantwortlich. Wie auch andere Nidoviren mit einem Genom von mindestens 26 kb kodiert der ORF1b des WBV für eine Vielzahl von Enzymen mit Polymerase-, Helikase-, Ribose-Methyltransferase-, Exoribonuklease- und Endoribonukleaseaktivität. Auf dem ORF1a sind Motive verschiedener Membrandomänen, einer ADP-Ribose 1-Phosphatase und einer Chymotrypsin-„like" Serinprotease lokalisiert. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse erster molekularbiologischer Studien auf eine Einordnung des WBV innerhalb der *Nidovirales* mit deutlicher Abgrenzung zu den Vertretern der *Coronaviridae*, *Arteriviridae* und *Roniviridae* hin.

Vergleichende Untersuchungen zu Ultrastruktur und Replikation des White bream virus und des Berne Virus (Genus *Torovirus*)

Granzow, H.*, Schirrmeier, H., Schütze, H. und Fichtner, D.

Molekularbiologische Vergleichsuntersuchungen des White bream virus mit anderen Viren ließen Ähnlichkeiten im Genom mit Spezies der *Coronaviridae* (Genus *Torovirus*) erkennen. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden Virusmorphologie und Replikationsstadien des White bream virus mit denen eines equinen Torovirus (Berne Virus, EToV) verglichen. Beide Viren replizieren sich im Zytoplasma. Starre, tubuläre Nukleokapsidstrukturen des White bream virus wurden durch Budding-Prozesse an Membranen des rER, einschließlich perinukleärer Zisterne, und des Golgi-Apparates umhüllt. Die ebenfalls tubulären Nukleokapsidstrukturen des EToV wurden an den gleichen Membranen umhüllt. Im Gegensatz zum White bream virus befand sich die Mehrzahl von Virionen in dilatierten Zisternen des rER. Nach Umhüllung besaßen beide Viren ein bacilliformes Aussehen mit langen Spikes auf ihrer Oberfläche. Während nach Verlassen der Wirtszelle beim Güstervirus äußere und innere Morphologie unverändert blieben, traten beim EToV deutliche Formveränderungen auf. Eine Instabilität der Virusstrukturelemente führte hier zu Viruspartikeln von ovalem, sphärischem, länglichem oder nierenförmigem Aussehen. Auffällig beim EToV waren Einschlüsse aus vermutlich aggregierten Nukleokapsidstrukturen in Zellkern und Zytoplasma. Ansammlungen von Nukleokapsiden traten beim White bream virus nur im Zytoplasma auf.

2 IMMUNOLOGIE

2.1 IMMUNSYSTEM DES SCHWEINES

Isolierung des Gens für das porcine Interferon kappa (IFNκ)

Voigt, H. und Pfaff, E.*

Haut und Schleimhäute bilden die Barriere zwischen Organismus und Außenwelt. Ein Großteil der Krankheitserreger tritt über diese Oberflächen in den Organismus ein. Um dies zu verhindern, sind Haut

und Schleimhäute immunologisch sehr aktive Kompartimente. Das hier vorhandene Schleimhautimmunsystem erkennt und bekämpft Krankheitserreger noch vor dem Eintritt in den Organismus. Deshalb stellt die Induktion von Immunmechanismen des Schleimhautimmunsystems eine interessante Option in der Impfstoffentwicklung dar. Die Effektoren des Schleimhautimmunsystems unterscheiden sich teilweise von ihren systemisch gefundenen Homologen. Als prominentes Beispiel sei nur der auf mucosale Oberflächen sezernierte Antikörper vom Isotyp IgA genannt. Einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen stellen die Typ-I-Interferone dar. Sie verhindern zum einen die Virusvermehrung in der infizierten Zelle, zum anderen sind sie in der Lage, Immunzellen zu stimulieren und hierdurch die Ausbildung der adaptiven Immunantwort zu unterstützen. Aus den Keratinozyten von Haut und Schleimhäuten konnte ein spezielles Typ-I-Interferon, das Interferon kappa, bei verschiedenen Spezies isoliert werden. Wir beschäftigen uns mit der Isolierung dieses Gens vom Schwein und konnten ein 572 bp großes Genfragment isolieren, das hohe Homologien zu den Interferon kappa Genen von Rind, Hund und Mensch auf Nukleotid- wie auch auf Aminosäureebene aufweist. Im weiteren Verlauf des Projektes sollen der N- und C-Terminus genauer charakterisiert werden. Hierauf aufbauend soll dann mit rekombinant erzeugtem Interferon kappa dessen biologische Funktion analysiert werden.

Etablierung von porcinen MHC II Tetrameren
Voigt, H., Wienhold, D. und Pfaff, E.*

In den letzten Jahren wurde die MHC Tetramer-Technologie entwickelt, welche es ermöglicht, unter Verwendung von mit spezifischen Peptiden beladenen MHC Komplexen antigen-spezifische T-Zellen zu identifizieren. Hiermit können sowohl die Peptid-Liganden des MHC Klasse II Proteins (Epitopmapping) als auch die Induktion spezifischer T-Helfer Zellen nach Immunisierungen untersucht werden. Dies war besonders bei der Identifizierung von $CD8^+$ MHC Klasse I abhängigen T-Zellen erfolgreich, während sich die Identifikation von $CD4^+$ MHC Klasse II abhängigen T-Zellen wesentlich schwieriger gestaltete. Da sich die wenigen MHC Klasse II Tetramer Studien hauptsächlich mit murinen und humanen MHC Klasse II Molekülen beschäftigen, ist das Ziel dieses Projektes die Konstruktion eines porcinen MHC Klasse II SLA-DQ Tetramers für die funktionelle und strukturelle Charakterisierung des porcinen MHC-peptide-TCR Komplexes. Das MHC II Molekül ist ein Oberflächenantigen, das aus einer alpha- und einer beta-Kette besteht, die über ihre Transmembrandomäne ein Heterodimer bilden und in der Plasmamembran verankert sind. Mit Hilfe von RNA aus Splenozyten und unter Verwendung spezifischer Primer konnten beide Untereinheiten des MHC II Moleküls isoliert werden. Ausgehend von den Sequenzen wurden zwei Expressionskassetten hergestellt, welche neben den extrazellulären Domänen der alpha- bzw. beta-Kette ein Dimerisationsmotiv anstelle der Transmembrandomäne sowie ein Biotinylierungsmotiv für die Bildung des MHC II Tetramers enthielten. Diese Kassetten wurden getrennt in einen Baculovirus-Expressionsvektor inseriert und rekombinante Baculoviren hergestellt. Die Tetramerbildung erfolgt über die Anbindung des MHC Klasse II Heterodimers an Streptavidin. Die hierfür notwendige Biotinylierung soll posttranslatorisch im Expressionsystem erfolgen, wofür die Herstellung eines neuen rekombinanten Baculovirus erforderlich ist, in dem die alpha-Untereinheit mit ihrem Biotinylierungsmotiv und das biotinylierende Enzym koexprimiert werden. Nach Reinigung der Einzelketten und Heterodimerbildung kann dann die Tetramerformation stattfinden.

2.2 IMMUNSYSTEM DER WIEDERKÄUER

Zelluläre Immunologie und Immunität der Wiederkäuer

Mechanismus der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation

Ein zentraler Vorgang der zellulären Immunantwort von Vertebraten gegenüber Viren ist die MHC Klasse I (MHC I)-vermittelte Antigenpräsentation. Zelleigene und von Pathogenen stammende Proteinfragmente (Peptide) werden von MHC I-Molekülen gebunden und zur Zelloberfläche transportiert. Ein großer Teil der über MHC I präsentierten Peptide wird in der Zelle durch das Proteasom im Zytosol hergestellt. Peptide werden über den heterodimeren Peptidtransporter TAP und ATP-Hydrolyse in das ER überführt, wo die Beladung von MHC I erfolgt. Die beladenen MHC I-Moleküle verlassen das endoplasmatische Retikulum (ER) und präsentieren nach Transport über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) die Peptide auf der Zelloberfläche. Die Präsentierung eines viralen Fremdpeptids aktiviert das Immunsystem und führt zur Eliminierung der virusinfizierten Zelle durch zytotoxische T-Zellen.

Funktion und Biogenese des Peptidtransporters TAP

Leonhardt, R.M., Keusekotten, K., Ehses, S. und Knittler, M.R.*

Die Klärung der molekularen Funktionsweise sowie der zellulären Biosynthese des Peptidtransporters TAP, der eine Schlüsselfunktion während der Antigenprozessierung übernimmt, ist eine entscheidende Voraussetzung für das nähere Verständnis der antiviralen Immunantwort sowie gezielter therapeutischer Eingriffe in die zelluläre Immunabwehr von Vertebraten.

Unsere Studien zeigen, dass die beiden homologen Untereinheiten des Peptidtransporters, TAP1 und TAP2, eng kooperieren und unterschiedliche Aufgabenbereiche während der ATP-vermittelten Peptidtranslokation übernehmen. Während die TAP2-Untereinheit ATP-abhängig die Bindung von Peptidsubstraten kontrolliert, begleitet die ATP-Hydrolyse über TAP1 den Prozess des Peptidtransports. In weiteren Forschungsarbeiten konnten die Sequenzbereiche, die für diese Asymmetrie der TAP-Untereinheiten verantwortlich sind, identifiziert und funktional charakterisiert werden.

Zusammen mit dem Brückenmolekül Tapasin und den akzessorischen Chaperonen Calreticulin und ER60 bildet TAP einen hochmolekularen Beladungskomplex (peptide loading complex, PLC) im ER, der die korrekte Peptidbeladung von MHC I-Molekülen kontrolliert. Die Ergebnisse unserer Arbeiten lassen den Schluss zu, dass die über Tapasin vermittelte Interaktion von MHC I mit dem PLC an den ATP-getriebenen Transportzyklus von TAP gekoppelt ist und so die Prozesse von Peptidtransport und MHC I-Beladung im Beladungskomplex direkt koordiniert werden. Beide Untereinheiten von TAP interagieren mit Tapasin über ihre N-Termini, die so genannten N-Domänen. Analysen unseres Labors weisen darauf hin, dass TAP zu jedem gegebenen Zeitpunkt des Peptidtransportzyklus lediglich über eine seiner beiden N-terminalen Tapasin-Bindestellen mit MHC I-Molekülen assoziiert ist. Interessanterweise zeigte sich, dass das Vorhandensein der N-Domäne in TAP2, nicht aber der korrespondierenden N-Domäne in TAP1 für die stabile Rekrutierung akzessorischer Chaperone sowie die Beladung von MHC I-Molekülen mit hochaffinen Peptid-Liganden wichtig ist. Dies verdeutlicht die funktionale Bedeutung PLC-gebundener Chaperone für die Qualitätskontrolle der MHC I-Beladung im ER.

Studien zur Biogenese von TAP ergaben, dass TAP2, im Gegensatz zu TAP1, nur eine sehr kurze *In-vivo*-Halbwertszeit besitzt und neu synthetisierte TAP2-Untereinheiten ausschließlich über die funktionale Dimerisierung mit präexistierenden langlebigen TAP1-Untereinheiten stabilisiert werden. Dies lässt erstmalig vermuten, dass die Menge assemblierter transportaktiver TAP-Moleküle im ER direkt über die zelluläre Expressionsrate von TAP1 reguliert wird und liefert eine Erklärung für die bisher ungeklärte Beobachtung, dass die ausgeprägte Induktion der TAP1-Synthese durch immunrelevante Zytokine und Transkriptionsfaktoren die Anzahl funktionaler heterodimerer TAP-Moleküle in der Zelle bestimmt.

Zellbiologische und biochemische Untersuchungen zur MHC Klasse I-vermittelten Antigenpräsentation mit Hilfe von Modellviren

Leonhardt, R.M., Keusekotten, K., Rufer, E. und Knittler, M.R.*

Viren, die vom Immunsystem nicht erkannt werden, haben einen enormen Selektionsvorteil hinsichtlich ihrer Replikation und Ausbreitung. Dies trifft insbesondere für solche Viren zu, die von sich aus nur einen schwachen Stimulus des Immunsystems bewirken, etwa durch unterschwellige Replikation, oder Vermehrung nur in bestimmten Organen und Geweben, oder die Mechanismen entwickelt haben, die aktiv in die Stärke und Effizienz der Immunantwort eingreifen. Beispiele hierfür sind bei Tier und Mensch bekannt und führen zu Virusvermehrung in hohen Titern sowie anschließender massiver Virusausscheidung, die epidemiologisch von Bedeutung sein können.

Über Millionen von Jahren der Koevolution mit ihren Wirten haben eine Vielzahl viraler Pathogene ausgeklügelte Strategien entwickelt, um der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation zu entgehen. Nahezu alle Schritte der Antigenpräsentation dienen als Angriffsziel. VIPRs (viral proteins interfering with antigen presentation), stellen eine spezifische Anpassung viraler Pathogene an die Immunantwort ihrer Wirte dar und dienen als wichtige Werkzeuge bei der Aufklärung immunologischer Mechanismen der Antigenprozessierung in unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Mensch, Maus und Rind.

VIPRs einiger Viren bewirken eine suboptimale Peptidbeladung von MHC I im ER und die Bildung instabiler MHC I-Peptid-Komplexe. Studien unseres Labors zeigen, dass ein post-ER-Mechanismus, der die katalytische Aktivität von TGN-lokalisierten Proproteinkonvertasen (PPCs) benötigt, eine stabile Oberflächenexpression von MHC I-Peptid-Komplexen ermöglicht, wenn die Bildung stabiler MHC I-Peptid-Komplexe im ER beeinträchtigt ist. Dies lässt erstmalig annehmen, dass Zellen über eine Gegenstrategie verfügen, welche die Anstrengungen von Viren, der Antigenpräsentation zu entkommen, untergräbt. Auf der Grundlage dieses neu entdeckten PPC-abhängigen MHC I-Präsentationsweges

untersuchen wir zurzeit die molekulare Wirkungsweise von VIPRs unterschiedlicher boviner Modellviren, welche die Prozesse der MHCI-Reifung entlang des sekretorischen Weges im ER und/oder im TGN attackieren.

Weitere Projekte

Entwicklung und Etablierung von Modellsystemen zur Untersuchung immunologischer Reaktionen bei Wiederkäuern
Rufer, E. und Knittler, M.R.

Zellbiologische und biochemische Untersuchungen zur Funktion des TAP-assoziierten Beladungskomplexes in Rind, Ratte, Maus und Mensch
Rufer, E. und Knittler, M.R.

Studien zur Funktion von Proproteinkonvertasen (PPCs) bei der MHC I-vermittelten Antigenprozessierung
Leonhardt, R.M., Rufer, E. und Knittler, M.R.

Regulation immunrelevanter Proteinexpression in antigenpräsentierenden Zellen
Leonhardt, R.M., Rufer, E. und Knittler, M.R.

2.3 IMMUNSYSTEM DES GEFLÜGELS

γδ T-Zell-Subpopulationen und ihre Reaktion auf *Salmonella*-Infektion und -Immunisierung im Geflügel
Berndt, A.*, Pieper, J. und Methner, U.

Den γδ T-Zellen wird ein entscheidender Einfluss auf den Verlauf verschiedener Infektionskrankheiten zugeschrieben. Ziel der vorliegenden Studie war die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von γδ ($TCR1^+$) T-Zellen im Rahmen der aviären Immunantwort. Dazu wurden Eintags-Hühnerküken oral mit *Salmonella* (*S.*) Enteritidis-Lebendimpfstoff oder *S.* Enteritidis (Wildtyp-Stamm) immunisiert und am 44. Lebenstag mit *S.* Enteritidis (Wildtyp-Stamm) infiziert. Das Auftreten verschiedener γδ-T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Expression von T-Zell-Antigenen zwischen Lebenstag 3 and 71 untersucht. Mittels Immunhistochemie wurde die Verteilung von $TCR1^+$-, $CD8\alpha^+$- und $CD8\beta^+$-Zellen in verschiedenen Geweben bestimmt.
In vorausgegangenen Studien konnten bereits drei verschiedene $TCR1^+$ Zellpopulationen im peripheren Blut definiert werden. Diese zeigten auffällige Unterschiede insbesondere bezüglich der CD8α-Antigen-expression: (i) $CD8\alpha^{+high}/TCR1^+$ -Zellen; (ii) $CD8\alpha^{+dim}/TCR1^+$ -Zellen und (iii) $CD8\alpha^-/TCR1^+$ -Zellen. Während die meisten der $CD8\alpha^{+high}/TCR1^+$-Zellen das heterodimere CD8αβ-Antigen exprimierten, zeigten die $CD8\alpha^{+dim}/TcR1^+$-Zellen überwiegend eine Positivität für die homodimere CD8αα-Form. Jetzt wurde nach Immunisierung ein signifikanter Anstieg von $CD8\alpha\alpha^{+high}/TCR1^+$-Zellen innerhalb der $CD8\alpha^{+high}/TCR1^+$-Zellpopulation festgestellt. Mittels quantitativer RT *real-time* PCR konnte eine verminderte IL-7Rα- und Bcl-x- bzw. eine erhöhte IL-2Rα-mRNA-Expression durch diese $CD8\alpha\alpha^{+high}/TCR1^+$-Zellen belegt werden. Nach *Salmonella*-Immunisierung konnten immunhistochemisch weiterhin ein signifikanter Anstieg von $CD8\alpha^+$- und $TCR1^+$-Zellen im Zäkum und in der Milz sowie eine Abnahme von $CD8\beta^+$ T-Zellen in der Milz detektiert werden. Die Immunreaktion nach Infektion bereits immunisierter Tiere beschränkte sich auf das intestinale Gewebe. Die Studie belegt erstmalig, dass eine *Salmonella*-Immunisierung sehr junger Hühnerküken von einem Anstieg der $CD8\alpha\alpha^{+high}$ γδ-T-Zellen im peripheren Blut begleitet ist. Es wird postuliert, dass es sich hierbei um eine aktivierte Zellpopulation mit wesentlicher Funktion im Rahmen der Entwicklung einer protektiven Immunantwort auf *Salmonella*-Organismen in Hühnerküken handelt.

Weitere Projekte

Untersuchungen zur Reaktion von Makrophagen nach *Salmonella*-Infektion *in vitro*
Berndt, A. und Methner, U.

Funktionelle Charakterisierung von γδ T-Zellen
Berndt, A., Pieper, J. und Methner, U.

2.4 IMMUNSYSTEM DER FISCHE – GRUNDLAGENUNTERSUCHUNGEN

Grundlagenuntersuchungen zum Immunsystem der Fische
Bergmann, S.M., Fischer, U.*, Karger, A., Keil, G., Kock, H., Köllner, B. und Schütze, H.
(in Zusammenarbeit mit Aastet, B., Schmidt, J. [The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark]; Hayashi, N., Dijkstra, J.M. [Fujita Health University, Toyoake, Japan]; Jaureguiberry, B.L. [Veterquimica Ltda, Santiago, Chile]; Lorenzen, N., Einer-Jensen, K. [Danish Institute for Food and Veterinary Research, Aarhus, Dänemark]; Løvoll, M., Dalmo, R.A. [Universität Tromsø, Norwegen]; Ototake, M. [National Research Institute of Aquaculture, Tamaki, Japan]; Vesely, T. [Veterinary Research Institute, Brno, Tschechische Republik])

Monoklonale Antikörper (mAk) gegen Leukozytendifferenzierungsmarker
Im letzten Jahr wurden verschiedene Leukozytendifferenzierungsmarker in pcDNA6V5-His Vektoren kloniert. Mit diesen Plasmiden wurden HEK 293T-Zellen transfiziert und mittels anti-Flag-Antikörper immunmagnetisch angereichert. Bisher haben wir Balb/C Mäuse mit CD8α- bzw. CD8β- transfizierten 293T-Zellen immunisiert. In Hyperimmunseren konnten CD8-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Fusionsexperimente zur Generierung monoklonaler Antikörper gegen beide CD-Marker werden in diesem Jahr durchgeführt. Versuche zur Etablierung eines Screeningsystems auf der Basis von transfizierten Forellenzelllinien gestalteten sich schwierig. RTO-, RTG-2- und RTE-Zellen ließen sich nicht mit einem Kontrollplasmid (pcDNA-gfp) transfizieren. Die Transfektionseffizienz auf RTG-2-Zellen ist bisher noch zu gering. Erste Versuche mit RTG-2-Zellen, die an eine Kultivierungstemperatur von 26 °C adaptiert wurden, brachten eine deutlich höhere Transfektionseffizienz.
In Kooperation mit Bent Aastedt (Kopenhagen) wurden verschiedene mAk, die spezifisch mit Leukozytensubpopulationen der Forelle reagieren, immunchemisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass der Thrombozyten-spezifische mAk15 sehr wahrscheinlich mit einer Integrin β2-Untereinheit reagiert.

Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von CD8$^+$ T-Zellen bei Forellen
Bisher sind bei Fischen keine Antikörper gegen CD8 beschrieben worden, was die funktionelle Charakterisierung CD8$^+$ zytotoxischer T-Zellen erheblich erschwert. Für die Produktion von mAk wurden CD8α und CD8β kloniert und die entsprechenden rekombinanten Proteine in Säuger-Zellen transfiziert. Letztere wurden zur Immunisierung von Mäusen und zum *screening* entsprechender Antiseren benutzt (siehe oben).
Gleichzeitig wurden CD8α und CD8β in *E. coli* zur Expression gebracht und für die Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen verwendet. Seren gegen CD8α reagierten mit Oberflächenantigenen auf Leukozyten DNA-immunisierter Forellen. Die Milz des Kaninchens soll für die Herstellung von Kaninchenhybridomen verwendet werden.
CD8α von Säugern verfügt über ein p^{56} lck-Signalpeptid und bildet Homo- und Heterodimere mit CD8β. CD8β-Homodimere werden wegen des fehlenden p^{56} lck-Signalpeptides nicht exprimiert. Bei Forellen besitzen sowohl CD8α als auch CD8β ein putatives p^{56} lck-Motiv, so dass auch CD8β-Homodimere denkbar sind. Um dies zu beweisen, untersuchen wir die Stöchiometrie von CD8α und CD8β mittels RT *real-time* PCR unter Verwendung eines chimären CD8α/β-RNA-Standards. Um ferner festzustellen, ob CD8α und CD8β gleichzeitig von denselben Zellen exprimiert werden, sind erste *In-situ*-mRNA-Hybridisierungsversuche (ISH) mit DIG- und Biotin-markierten RNA- und DNA-Sonden durchgeführt worden.

Zellvermittelte Zytotoxizität gegen virusinfizierte Zellen
In einer ausgedehnten Versuchsreihe wurde die zellvermittelte Zytotoxizität peripherer Blutleukozyten (PBL) gegen virusinfizierte Zellen quantifiziert. Die PBL stammten von klonalen Forellen, die bei 15 °C gehalten und mit Plasmid-DNA i.m. immunisiert wurden, die VHSV- bzw. IHNV-G-Protein kodieren. Kontrolltiere erhielten leeres Plasmid oder Puffer. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität von Kontrolltier-PBL und PBL DNA-immunisierter Tiere gegen virusinfizierte Zellen festgestellt werden.

Untersuchungen zur Präsentation viraler Peptide
Um VHSV-spezifische Peptide zu bestimmen, die über MHC I präsentiert werden, wurden Peptide von der Oberfläche VHSV-infizierter Zellen eluiert und chromatographisch fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels LC-MS/MS Ionenfallenmassenspektrometer an der Fujita Health University in Toyoake, Japan, analysiert. Es wurden Peptide aus sechs Proteinen zuverlässig nachgewiesen, fünf davon aus bovinen Serumproteinen und eines aus Forellen-Cyclophilin. Keines dieser putativen MHC II-Peptide war VHSV-spezifisch, weshalb die Versuche mit serumfreiem Medium und auf einem MS/MS-Massenspektrometer wiederholt werden.

Untersuchungen zur NK-Zell-Rezeptorgen-Charakterisierung
Unspezifische angeborene Immunmechanismen sind bei Fischen als phylogenetisch alten Vertebraten wahrscheinlich von großer Bedeutung. Bei der Suche nach Zellmarkern mit Relevanz für solche Mechanismen wurden ESTs der Forelle mit signifikanter Homologie zu NKp44 Rezeptorgenen identifiziert. Mittels 5‘ und 3‘ RACE konnten komplette Transkripte nachgewiesen werden, die für zwei Protein-Isoformen kodieren. Anhand ihrer Domänenstruktur kann man diese in die Familie der *novel immune-type receptors* (NITR) einordnen, wobei sich die von uns neu entdeckten Forellen NITR-Sequenzen deutlich von bereits veröffentlichten NITR *loci* unterscheiden. Erste Expressionsstudien mit RNA aus naiven Fischen deuten auf hohe Transkriptionsraten einer kurzen Isoform in der Kopfniere sowie auf eine starke bis mäßige Transkription einer membrangebundenen langen Isoform in PBL, Kieme, Enddarm, Pylorus, Milz und Thymus hin. Zur weiteren Analyse der Expression dieser NITR-Isoformen in naiven und immunisierten Tieren sollen qRT-PCRs etabliert werden.

Untersuchungen zum Homing von Leukozyten
Zell-Homing ist ein chemotaktischer Prozess von Zell/Matrix- bzw. Zell/Zell-Interaktionen und wird durch eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen vermittelt, was schließlich zu einer Verankerung von Immunzellen an den für ihre Funktion vorgesehenen Orten führt. Dieser Prozess ist bei Fischen noch nicht beschrieben worden. Wir haben deshalb inflammatorische Zellen aus der Injektionsstelle von Plasmid-DNA, kodierend für das VHSV-Glykoprotein, mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und auf Rezipienten übertragen, denen vorher jeweils drei räumlich getrennte Injektionen mit einer homologen DNA-Vakzine und zwei heterologen rhabdoviralen DNA-Vakzinen intramuskulär appliziert wurden. Transferierte Zellen von immunisierten Donoren hatten eine höhere Affinität zu der Injektionsstelle der homologen DNA-Vakzine, was auf antigenspezifisches Homing hindeutet.

Regulation der C3-Subtypen in Salmoniden
Das Komplementsystem ist ein bedeutender Baustein angeborener und erworbener Immunmechanismen wie Phagozytose, Chemotaxis und Zelllyse. Die Komplementkomponente C3 ist zentraler Bestandteil der Komplementkaskade und gehört zu den Akut-Phase-Proteinen. Bei Säugern ist die Leber der Hauptort der C3-Expression, wobei extrahepatisches C3 von Zellen der Monozyten/Makrophagen-Reihe sezerniert wird. Bekanntermaßen stimulieren die Immunomodulatoren LPS und β-Glucan die Komplement- und Lysozymexpression bei Fischen. LPS und β-glucan können NK-Zellen und Antikörper produzierende Zellen aktivieren und erhöhen somit die Resistenz gegenüber bakteriellen und parasitären Infektionen. In unseren Versuchen zeigten Makrophagen aus der Kopfniere nach Immunstimulation *in vitro* eine erhöhte mRNA-Expression der IL-1β1-, IL-1β2- und IL-6-Gene, während eine Transkription der C3-Subtypen C3-1, C3-3 und C3-4 ausblieb. Dem gegenüber erfolgte nach *In vivo*-Immunostimulation eine differenzierte Regulation der C3-Gene in verschiedenen Organen. Diese Ergebnisse bestätigen *In-vitro*-Untersuchungen an drei anderen Fischspezies, wonach Fischmakrophagen keine C3-Gene exprimieren. Erstmals konnte jedoch eine differenzierte Regulation von C3-Subtypen in Vertebraten nachgewiesen werden.

3. BAKTERIEN

Aufbau einer Datenbank zur schnellen massenspektrometrischen Identifizierung und Differenzierung veterinärmedizinisch relevanter Bakterien

Karger, A.* und Polster, U.

Die massenspektrometrische Identifizierung von Bakterien bietet im Vergleich zu den klassischen bakteriologischen Verfahren interessante Einsatzmöglichkeiten, die in immer breiterem Rahmen genutzt werden. So ist die einzelne Analyse sehr preiswert und die Abarbeitung sehr hoher Probenzahlen (bis zu 1.000 pro Tag) mit der am FLI vorhandenen Ausrüstung möglich. Die Effizienz des Verfahrens ist im Wesentlichen abhängig vom Umfang der Datenbanken, die die Vergleichsspektren enthalten. Die sich rasch entwickelnden Referenzdatenbanken sind meist auf humanpathogene Erreger zugeschnitten. In Zusammenarbeit mit der Fa. Bruker Daltonics (Bremen) wurde der Aufbau einer Referenzspektrensammlung mit Schwerpunkt auf den veterinärmedizinisch bedeutsamen Krankheitserregern begonnen. Zunächst mussten die technischen Voraussetzungen zur Aufnahme von Referenzspektren geschaffen werden; die ersten Referenzspektren liegen nunmehr vor. Die Spektrenbank soll sukzessive ergänzt werden. Die Schwerpunkte sollen vorerst auf den bisher kaum in Datenbanken vertretenen veterinärmedizinisch relevanten Vertretern von Brucellen, Salmonellen, Mykobakterien und pathogenen Stämmen von *Escherichia coli* liegen.

3.1 CAMPYLOBACTER

Campylobacter (*C.*) *jejuni* ist weltweit einer der häufigsten Verursacher bakteriell bedingter Durchfallerkrankungen. Als Hauptquelle für humane Infektionen gelten Geflügelprodukte. Dabei reicht das klinische Spektrum von asymptomatischen Infektionen bis zu schweren blutigen Durchfällen. Eine Campylobacteriose steht vielfach auch am Beginn der Ausbildung des Guillain-Barré-Syndroms.
C. fetus subsp. *venerealis* ist der Erreger der „Vibrionenseuche" oder bovinen genitalen Campylobacteriose (bgC) bei Rindern. Diese venerische Infektionskrankheit ist 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, C . fetus* subsp. *fetus.* Dieser Keim hat sein natürliches Erregerreservoir im Intestinaltrakt des Rindes, doch ist auch er in der Lage, Aborte zu verursachen (sporadischer Abort). Die unterschiedliche Bedeutung der beiden Subspezies erfordert deren exakte Identifizierung.

Untersuchungen zur Charakterisierung von Virulenzfaktoren bei *Campylobacter jejuni*

Müller, J., Hänel, I., Meyer, B. und Hotzel, H.*

Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen humanen Gangliosiden und *C.-jejuni*-Lipooligosacchariden (LOS) könnten bei der Ausbildung des Guillain-Barré-Syndroms eine Rolle spielen. Durch die erfolgte Genomsequenzierung zweier *C.-jejuni*-Stämme konnte ein großes Gencluster identifiziert werden, welches in die LOS-Biosynthese eingebunden ist. Es gibt aber auch Hinweise, dass LOS-Strukturen für die Invasion von *Campylobacter* in Epithelzellen und damit für die Pathogenese der gastrointestinalen Erkrankungen wichtig sind.
In den Untersuchungen wurden 40 *C.-jejuni*-Stämme verwendet, die sich in vorhergehenden Untersuchungen im Kolonisationsvermögen des Kükendarms und dem Invasionsvermögen von Caco-2-Zellkulturen unterschieden. Siebzehn verschiedene Gene des LOS-Biosynthese-Clusters wurden durch PCR-Amplifikationen auf ihre Anwesenheit hin untersucht und in Verbindung mit dem Kolonisations- und Invasionsvermögen gebracht.
Ebenso untersucht wurde der Zusammenhang dieser Prozesse mit dem Vorkommen mehrerer putativer Galactosyltransferasen in den *C.-jejuni*-Stämmen.
Weitere Untersuchungen zur molekularen Pathogenese durch *Campylobacter jejuni* wurden durchgeführt. Die Infektion von Caco-2-Zellen mit diesem Mikroorganismus löst eine Veränderung des Genexpressionsprofils aus. Der zeitliche Verlauf der Expressionsveränderungen sollte festgehalten werden, um putative Pathogenitätsfaktoren zu bestimmen.

Caco-2-Zellen wurden mit dem Referenzstamm 81/176 infiziert, um nach zehn Minuten, 30 Minuten, einer Stunde und drei Stunden aus dem Überstand der Kultur, den Zellen mit den adherierten Bakterien und einem zellfreien Kontrollansatz RNA zu isolieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels *real-time* PCR nach cDNA-Synthese gegen potentielle Virulenz-assoziierte Gene deuten darauf hin, dass Veränderungen in allen Fraktionen kurzfristig einsetzen. Nach zehn Minuten zeigten sich die größten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollkultur.

Weitere Projekte

Vergleichende Untersuchungen zur Adhäsion von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* an humanen und aviären intestinalen Epithelzellen
Hänel, I. und Diller, R.

Untersuchungen zur molekularen Pathogenese durch *Campylobacter jejuni*
Meyer, B., Müller, J. und Hänel, I.

Validierung von molekularbiologischen Nachweismethoden für thermophile *Campylobacter* als Voraussetzung für Prävalenzuntersuchungen in der Geflügelhaltung
Hotzel, H. und Alter, T.

Molekularbiologische Typisierung deutscher *Campylobacter-fetus*-Isolate
Hotzel, H. und Müller, J.

Untersuchungen zum Überlebensverhalten von *Campylobacter-fetus*-Isolaten und anderer bakterieller Kontaminanten in verschiedenen Präputialspülflüssigkeiten
Hotzel, H.

Ultrastrukturelle Charakterisierung von *Campylobacter* -Stämmen im Negativkontrastverfahren
Liebler-Tenorio, E.M. und Hänel, I.

3.2 CHLAMYDIEN UND COXIELLEN

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien mit einem charakteristischen zweiphasigen Entwicklungszyklus. Die bekannteste durch Chlamydien verursachte Zoonose ist die Psittakose oder Ornithose, auch aviäre Chlamydiose genannt (Erreger: *Chlamydophila [Cp.] psittaci*). Eine weitere Infektion mit zoonotischem Potential ist der enzootische Schafabort (Erreger: *Cp. abortus*). Darüber hinaus sind die Chlamydiosen bei Rind und Schwein von ökonomischer Bedeutung. *Chlamydia trachomatis* und *Cp. pneumoniae* sind weit verbreitete humane Pathogene.

Einsatz des ArrayTube-Tests zum Direktnachweis von Chlamydien aus klinischen Proben – eine Validierungsstudie
Borel, N., Kempf, E., Hotzel, H., Schubert, E., Torgerson, P., Ehricht, P., Pospischil, A. und Sachse, K.*

Die DNA-Mikroarraytechnik eröffnet auch für die Diagnostik von Infektionskrankheiten neue Möglichkeiten. Ihr Einsatz ermöglicht die Untersuchung einer DNA-Probe mit einer großen Zahl von Sonden, welche aus einem polymorphen Gensegment und/oder aus verschiedenen genomischen Regionen abgeleitet werden können. Daher kann mit Hilfe von DNA-Mikroarraytests eine weit höhere Spezifität als mit PCR-Tests erreicht werden.
Während die DNA-Mikroarrays als Werkzeug zum mRNA-Expressionsmonitoring bereits eingesetzt werden, steckt ihr Einsatz zum Nachweis bakterieller und viraler Krankheitserreger noch in den Anfängen. Dabei galten bisher vor allem die Sensitivität der Methode und die Kosten als limitierende Faktoren für ihre Verwendung in der Routinediagnostik. Hier bietet das ArrayTube®(AT)-System jedoch eine kostengünstige Alternative, denn es verwendet einen relativ einfachen Transmissionsreader, die Mikrochips sind in gängige 1,5 ml-Plastik-Reaktionsgefäße integriert, und es benötigt keine Fluoreszenzfarbstoffe.
In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 339 Proben, davon 293 klinische Proben, mit dem AT-Mikroarraytest untersucht, um vorhandene Chlamydien-DNA nachzuweisen und die entsprechenden

Chlamydia- bzw. *Chlamydophila*-Spezies zu identifizieren. Es handelte sich um Nasen- bzw. Konjunktivaltupfer, formalin-fixierte, paraffin-eingebettete und frische Organ-Gewebeproben, Milch, Kot und Zellkultur. Die AT-Befunde wurden verglichen mit *real-time* PCR, konventioneller PCR, Immunhistochemie und weiteren Tests, wobei für den neuen Test hinreichend gute Leistungsparameter ermittelt wurden. Bemerkenswert ist, dass Mischinfektionen in klinischen Proben und experimentell infizierter Zellkultur mit dem AT-Test leicht detektiert wurden. Die berechnete Median-Sensitivität von 0,81 über die gesamte klinische Probenmenge war vergleichbar mit konventionellen PCR-Tests. Die Sensitivität für frische klinische Proben lag noch deutlich höher (0,87) und war damit der *real-time* PCR gleichwertig, sobald Proben (n=81) ausgeschlossen wurde, welche bereits ein Jahr alt war. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der vorliegende DNA-Mikroarray-Test für die Routinediagnostik geeignet ist.

Latente Infektionen mit *Chlamydophila abortus* und/oder *Chlamydophila pecorum* beeinträchtigen die Tiergesundheit in Kälberbeständen

Reinhold, P.*, Jäger, J., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Bachmann, R., Schubert, E., Melzer, F., Elschner, M. und Sachse, K.

Die hohen Nachweisraten von *Chlamydiaceae*-Spezies in Rinderbeständen stehen im scheinbaren Widerspruch zu den eher vereinzelten Berichterstattungen über das Vorkommen akuter klinischer Chlamydien-assoziierter Erkrankungen bei dieser Tierart. Im Rahmen der vorliegenden Studie war zu untersuchen, ob natürlich vorkommende latente Chlamydieninfektionen die Gesundheit von Jungrindern nachhaltig und dauerhaft beeinflussen. Fünfundzwanzig klinisch unauffällige Kälber wurden entsprechend ihrem Trägerstatus für Chlamydien in zwei Gruppen unterteilt (Gruppe I: Chl-, n=12; Gruppe II: Chl+, n=13) und vom 2. bis zum 7. Lebensmonat regelmäßig klinisch und hämatologisch untersucht. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden alle Tiere euthanasiert und seziert. Das Vorhandensein relevanter Co-Infektionen viraler oder bakterieller Genese konnte durch differentialdiagnostische Untersuchungen weitgehend ausgeschlossen werden.
Monatliche PCR-Untersuchungen an Nasen-, Kot- und Augentupfern zeigten persistierende oder häufig wiederkehrende Infektionen mit *Chlamydophila pecorum* und *Chlamydophila abortus* in Gruppe II auf, jedoch nicht in Gruppe I. Die Chlamydieninfektionen in Gruppe II wurden durch positive serologische Reaktionen bestätigt, wohingegen Gruppe I negativ blieb. Keines der 25 Tiere war klinisch erkrankt. Dennoch wiesen die Kälber aus Gruppe II signifikant höhere Rektaltemperaturen im subfebrilen Bereich, signifikant geringere Körpermassen sowie verminderte Eisenkonzentrationen im Blutserum und damit einhergehend geringere Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte im Blut auf. Des Weiteren ergaben Zellzählungen und flowzytometrische Untersuchungen, dass die Leukozytenzahl im peripheren Blut in Gruppe II deutlich niedriger war. Zum Zeitpunkt der Sektion wiesen die Tiere der Gruppe II im Vergleich zu Gruppe I ein höheres Gewicht der pharyngealen Tonsillen auf. Trotz des Fehlens klinischer Krankheitssymptome sind demnach natürlich vorkommende Infektionen mit *Chlamydophila* spp. mit chronischen Beeinträchtigungen der Tiergesundheit von jungen Rindern assoziiert.

Der Effekt einer therapeutischen *Chlamydophila abortus/pecorum*-Impfung auf Milchdrüsenentzündungen bei Milchkühen

Biesenkamp-Uhe, C., Li, Y., Hehnen, H.R., Sachse, K.* und Kaltenboeck, B.

Infektionen mit *Chlamydophila (Cp.) abortus* und *Cp. pecorum* kommen in Rinderbeständen sehr häufig vor und wurden u.a. mit Mastitiden assoziiert. Hier wird von einer prospektiven Kohortenstudie in einer Herde von 147 Holsteinrindern berichtet, die mit dem Ziel durchgeführt wurde, den Einfluss von *Chlamydophila*-Infektionen auf subklinische Euterentzündungen anhand der somatischen Zellzahlen in der Milch zu untersuchen. Die PCR-Nachweisraten von *Cp. abortus* und tendenziell niedrige Serum-Antikörpertiter gegen *Chlamydophila* spp. korrelierten signifikant mit dem Auftreten subklinischer Mastitis. Um den Einfluss der Chlamydieninfektion über eine Immunperturbation weiter zu charakterisieren, wurde eine experimentelle Vakzine aus inaktivierten Elementarkörpern von *Cp. abortus* und *Cp. pecorum* zweimal subkutan verabreicht. Diese Vakzinierung führte einerseits zur Senkung der somatischen Zellzahlen und damit auch der Mastitisrate, und andererseits zur Erhöhung der *Chlamydophila*-Antikörpertiter; es wurde jedoch keine Eliminierung der *Cp.-abortus*-Ausscheidung über die Milch erreicht, wie die PCR-Daten zeigten. Der protektive Effekt gegen die Erkrankung erreichte nach elf Wochen seinen Höhepunkt und dauerte insgesamt vierzehn Wochen an. Die Impfung mit der *Chlamydophila*-Vakzine, ebenso wie die Verabreichung der Kontrollvakzine bzw. einer Kombivakzine gegen virale Rindererkrankungen, führte zur

signifikant höheren *Cp.-abortus*-Ausscheidung in der Milch für eine Woche, was wahrscheinlich dem Adjuvans geschuldet war. Zusammenfassend zeigt die Studie eine ätiologische Beteiligung der weit verbreiteten *Chlamydophila*-Infektionen am Mastitisgeschehen, welches für die Milch produzierenden Betriebe von kritischer Bedeutung ist. Diese Untersuchung zeigt ferner die Möglichkeit einer temporären Verbesserung der Herdensituation durch therapeutische Vakzinierung. Darüber hinaus können die Erfahrungen mit der *Chlamydophila*-Impfung beim Rind auch für die Testung humaner Chlamydienvakzinen genutzt werden.

Studien zur Rolle von Chlamydien und Coxiellen als Aborterreger beim Rind und als Zoonoseerreger

Henning, K.*

Untersuchungen zum Vorkommen von Chlamydien im Sperma von Ebern und Bullen

Es gibt Hinweise, dass Chlamydien beim Rind und Schwein auch auf venerischem Wege übertragen werden können. Allerdings sind die Daten hierzu verhältnismäßig spärlich. Daher wurden in Zusammenarbeit mit der Universität Leipzig Sperma-Proben sowie Präputialwaschproben vom Bullen auf Chlamydien untersucht. Da Fäzes möglicherweise als Reservoir für eine Kontamination des Penis mit Chlamydien dient, wurden auch Fäzes-Proben genommen. Ebenso wurden Sperma-Proben sowie Fäzes-Proben vom Eber untersucht.
Im Rahmen dieser Studien wurden serologische Untersuchungen und Anzuchtversuche mit Chlamydien-PCR-positiven Proben durchgeführt. Allerdings musste hierfür zunächst ein spezielles Verfahren entwickelt werden, da, im Gegensatz zu Organproben, Spermaproben meistens zytotoxisch auf Zellkulturen wirken. Auch sind Sperma-Proben üblicherweise sehr mit Begleitkeimen belastet, die sich nur schwer mit Antibiotika unterdrücken lassen. Mittels artifiziell kontaminierter Sperma-Proben konnte gezeigt werden, dass Chlamydien diese Umgebungsbedingungen überstehen und sich effektiv aus diesen Proben isolieren lassen.
Beim Bullen wurden in 9.2 % der Sperma-Proben, in 10.7 % der Präputialwaschproben und in 18.0 % der Fäzes-Proben Chlamydien nachgewiesen. Eine Anzucht von Chlamydien aus diesen Proben gelang nicht. Im ELISA reagierten 50.8 % der Bullen-Seren Chlamydien-Antikörper-positiv. Eine Beziehung zwischen Erregernachweis und den serologischen Daten konnte nicht hergestellt werden.
Auch beim Eber konnten sowohl im Sperma als auch in den Fäzes sehr häufig Chlamydien nachgewiesen werden. Im Chlamydien-Antikörper-ELISA reagierten 46.8% (Studie A) bzw. 9.7% der Eber-Seren positiv. Ebenso wie beim Bullen gab es auch hier keine Beziehung zwischen den serologischen und molekularbiologischen Daten.
Die Studien belegen, dass Chlamydien in nicht unerheblichem Maße im Sperma von Bullen und Ebern vorkommen und dass der Deckakt als Übertragungsweg für Chlamydien in Betracht gezogen werden muss. Auf Grund der Verteilung der Chlamydien-Spezies in den untersuchten Proben ist zu schließen, dass die Fäzes vermutlich nicht die alleinige Quelle für eine Kontamination/Infektion des Geschlechtsapparates beim männlichen Tier ist. Da weder beim Bullen noch beim Eber eine Beziehung zwischen dem molekularbiologischen Erregernachweis und den serologischen Daten hergestellt werden konnte, folgt, dass eine Identifizierung von Chlamydien-Ausscheidern mittels serologischer Methoden nicht möglich ist.

Untersuchungen zum Vorkommen von Coxiellen in Zecken

Der Erreger des Q-Fiebers, *Coxiella burnetii*, ist ein sehr kleines, gramnegatives, obligat intrazelluläres Bakterium. Der Erreger hat ein breites Wirtsspektrum, ist aber insbesondere als Aborterreger bei Wiederkäuern von Bedeutung. Der Erreger wird u.a. über Zecken übertragen. Daher werden Zecken mittels Zellkultur und PCR auf *Coxiella burnetii* untersucht. Dieses Projekt steht im Zusammenhang mit einem Q-Fieber-Ausbruch in Thüringen im Herbst 2005, bei dem über 300 Menschen erkrankten.

Pathologie von chronischen Infektionen der Lunge mit *Chlamydophila* spp. beim Rind mit subklinischem Verlauf

Liebler-Tenorio, E.*, Jäger, J. und Reinhold, P.

Chlamydieninfektionen wurden auch beim Rind im Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen nachgewiesen. In die Untersuchung wurden dreizehn Tiere aus einem Bestand, in dem Chlamydieninfektionen häufig waren, und zwölf Kontrolltiere aus einem Bestand, in dem Atemwegserkrankungen

selten waren, einbezogen. Alle Tiere wurden im Alter von zwei bis drei Wochen angekauft, und über einen Zeitraum von sechs Monaten regelmäßig klinisch untersucht und verschiedenen Lungenfunktionstests unterzogen. Anschließend wurden die Tiere getötet und bei der Sektion Proben aus jedem Lungenlappen entnommen, in Paraffin eingebettet oder schockgefroren und histologisch untersucht. Bei den Tieren aus infizierten Beständen war deutlich mehr und stärker aktiviertes bronchusassoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT) als bei den Kontrolltieren zu finden. Eine Einengung der Bronchien und Bronchiolarlumina durch sehr große Lymphfollikel und intraluminale Ansammlung von Schleim und Entzündungszellen sowie eine Hyperplasie des Bronchialepithels wurde bei zwölf der dreizehn Tiere dieser Gruppe beobachtet. Bei den Tieren der Kontrollgruppe kam es nur vereinzelt zu einer Einengung der Bronchiallumina. Diese morphologischen Befunde korrelieren gut mit den Befunden der Lungenfunktionsdiagnostik. Mittels indirekter Immunperoxidasemethode und monoklonalen Antikörpern gegen Chlamydien-LPS konnten auch in den am deutlichsten veränderten Lungenarealen (im rechten und linken, cranialen und caudalen Spitzenlappen) keine Chlamydien nachgewiesen werden. Dies entspricht Literaturbefunden, die von einer transienten Infektion und einer Zerstörung der Chlamydien während der akuten Entzündungsphase berichten. Somit bleiben die Pathogenese und Dauer der beobachteten Veränderungen in den Bronchien und Bronchiolen unklar.

Weitere Projekte

Entwicklung neuer DNA-Mikroarray-basierter diagnostischer Tests zum schnellen Nachweis und zur Genotypisierung von Chlamydien
Sachse, K., Schubert, E. und Sprague, L.

Erregerreservoire und zoonotische Bedeutung von Chlamydien
Sachse, K., Reinhold, P., Schubert, E. und Hotzel, H.

Vorkommen von Chlamydien im Reproduktionstrakt von Schwein und Rind und deren mögliche Bedeutung im Fertilitätsgeschehen
Sachse, K., Schubert, E., Sprague, L., Berndt, A. und Liebler-Tenorio, E.

3.3 ESCHERICHIA COLI (E. COLI)

Shiga-Toxin produzierende *E. coli* (STEC) stellen eine Gruppe von bedeutenden bakteriellen Zoonoseerregern dar. Einige STEC-Serotypen können beim Menschen Infektionen verursachen, in deren Ergebnis schwere klinische Erkrankungen wie Hämorrhagische Colitis (HC) oder das Hämolytisch Urämische Syndrom entstehen können.

Shiga-Toxin produzierende *E. coli* (STEC/Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC))

Geue, L.* und Conraths, F.J.

Als Hauptvirulenzfaktor von STEC wird die Fähigkeit zur Bildung von Zytotoxinen, so genannten Shiga-Toxinen, angesehen. Innerhalb der Shiga-Toxin-Familie unterscheidet man zwischen dem Shiga-Toxin 1 (Stx1) und den Varianten Stx1c und Stx1d sowie verschiedenen Shiga-Toxin 2 (Stx2)-Varianten (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f), die entweder allein oder aber auch in Kombination von verschiedenen Stämmen gebildet werden können. Zusätzlich zu den genannten Shiga-Toxinen tragen aber auch plasmidkodierte Virulenzfaktoren (ein Enterohämolysin [hly_{EHEC}], eine Katalase-Peroxidase [*katP*] und eine extracelluläre Serineprotease [*espP*]) sowie eine Pathogenitätsinsel mit einer Gruppe von ca. 50 chromosomalen Genen, die auch als „locus of enterocyte effacement" oder LEE-Lokus bezeichnet wird, entscheidend zur Pathogenität von EHEC bei. Besonders das auf dem LEE lokalisierte *eae*-Gen („*E. coli* attaching and effacing"), das für einen als Intimin bezeichneten Adhärenzfaktor kodiert, wird, von einigen Ausnahmen abgesehen, regelmäßig bei EHEC-Stämmen, die schwere klinische Erkrankungen hervorrufen, gefunden. Das efa1 Gen (*E. coli* factor for adherence) wurde als ein zusätzlicher Kolonisierungsfaktor in einem EHEC O111:H- Stamm identifiziert.
Das Hauptreservoir für STEC/EHEC stellen Rinder, andere landwirtschaftlich genutzte Wiederkäuer wie Schafe und Ziegen sowie Wildwiederkäuer dar. Unzureichend gegartes Rindfleisch, Rohmilch und Rohmilchprodukte bzw. nicht pasteurisierte Milch sowie andere Produkte von Rindern werden als hauptsächliche Infektionsquelle des Menschen beschrieben. Daneben darf aber auch die Gefahr von

Infektionen durch direkten Kontakt zu Tieren (Streichelzoos, Besuche von landwirtschaftlichen Betrieben, Ferien auf dem Bauernhof) sowie die fäkal-orale Übertragung von Mensch zu Mensch, besonders in Gemeinschaftseinrichtungen, nicht übersehen werden.

Räumliche und zeitliche Verteilung sowie Ausbreitungsdynamik von STEC/EHEC der Serovare O26, O156 und O172 isoliert aus Rindern
Geue, L.*

Bei Shiga-Toxin produzierenden *Escherichia coli* (STEC) der Serogruppen O26, O156, O159 und O172, die während eines dreijährigen Monitoring-Programms in großer Zahl aus Rindern isoliert worden waren, konnte eine Reihe von Virulenzmarkern (*stx1*und/oder *stx2, eae* und *eas*-Subtypen*, tir* und *tir*-Subtypen*, hly*$_{EHEC}$, *katP*, *espP, lifA*) nachgewiesen werden, die in hohem Maße mit dem Auftreten von HUS (Hämolytisch Urämisches Syndrom) bzw. HC (Hämorrhagische Colitis) beim Menschen korrelieren. Die räumliche und zeitliche Verteilung sowie die Ausbreitungsdynamik verschiedener identifizierter klonaler Gruppen innerhalb der einzelnen Serovare wurden analog zu den Untersuchungen beim STEC-O165:H25 auf der Basis molekular-genetischer Techniken analysiert.
Unsere Untersuchungen zeigen, dass innerhalb der einzelnen Serovare verschiedene klonale Gruppen existieren können. Das Auftreten solcher klonalen Gruppen scheint räumlich und zeitlich begrenzt zu sein. Mittels Clusteranalysen konnte gezeigt werden, dass auch innerhalb der einzelnen klonalen Gruppen über die Zeit genetische Veränderungen stattfinden. Mögliche Hinweise auf Ursachen für das Verschwinden klonaler Gruppen aus den Rinderherden wurden diskutiert.

Anwendung der Multilokus Sequenztypisierung (MLST) zur Charakterisierung von STEC/EHEC-Stämmen isoliert aus Rindern und Menschen
Geue, L.*

Die Multilokus Sequenztypisierung (MLST) ist eine schnelle Sequenziermethode, bei der Allel-Varianten in konservierten Genen für die Charakterisierung, Subtypisierung und Klassifizierung von Bakterien herangezogen werden. Bei *E. coli* werden Fragmente aus sieben über das Chromosom verteilte *housekeeping* Gene (Loci) durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Für jedes untersuchte Isolat entsteht so ein charakteristisches Allel-Profil. Anhand dieser Allel-Profile können nun einzelne Isolate sehr einfach miteinander verglichen werden. Allele und Allel-Profile sind in öffentlich zugänglichen Datenbanken hinterlegt. Damit ist es möglich, Daten zwischen Labors weltweit auszutauschen.
Wir erstellten die kompletten Allel-Profile von verschiedenen STEC/EHEC-Stämmen, die aus Rindern und Menschen isoliert worden waren. Die Isolate waren deutscher bzw. afrikanischer Herkunft. Die Allel-Profile wurden mit anderen verglichen und den internationalen Datenbanken übermittelt.

Weitere Projekte

Sequenzierung und Strukturanalyse der Pathogenitätsinsel (PAI) des Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) O165:H25 Stammes Wus 02/09/010-1 isoliert aus einem Rind
Geue, L., Jores, J. und Wieler, L.H.

Diagnostic test evaluation with and without gold standard using conventional, maximum likelihood, and Bayesian statistics for virulence factors of bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)
Döpfer, D., Geue, L., Buist, W. und Engel, B.

Persistence and transmission of virulence factors encoded by verotoxin producing *E. coli* and their control
Grohn, Y. et al.

3.4 FRANCISELLEN

Tularämie ist eine Zoonose, die durch das kleine pleomorphe, hitzelabile, Gram-negative und kurzstäbige Bakterium *Francisella (F.) tularensis* verursacht wird. Dieses fakultativ intrazelluläre Pathogen infiziert weit mehr Wirte als jeder andere zoonotische Keim. Tularämie ist endemisch in der nördlichen Hemisphäre weltweit. Die Spezies *F. tularensis* beinhaltet drei Subspezies: *F. tularensis* ssp. *tularensis* (Typ A), ssp. *holarctica*

(Typ B) und ssp. *mediasitica*. Typ A-Stämme sind vorrangig in Nordamerika verbreitet, sie wurden aber auch in der Donauregion um Bratislava nachgewiesen. Typ B-Stämme und ssp. *mediasiatica* sowie *F. novicida* und *F. philomiragia* sind in Europa, Nordasien und Nordamerika verbreitet. Über die Prävalenz der Tularämie in der Bevölkerung und der tierischen Population in den Ländern Zentraleuropas ist wenig bekannt.

Nachweis von *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* bei einem Feldhasen in Thüringen
Müller, W.*, Neubauer, H. und Otto, P.

F. tularensis ist in der Lage eine Vielfalt von Säugern – Mensch, Hasenartige und Nager eingeschlossen – zu infizieren. Zu den Hauptwirten zählen Hasen und Kaninchen, Wasser- und Wühlmäuse, Wasser- und Waldratten, Eichhörnchen, Lemminge, Hamster, Feldmäuse und ebenso Wassernager wie Biber und Bisamratte. Zu den Säugern, die für *F. tularensis* empfänglich sind, gehören Affen, Hunde, Katzen, Schafe und Rinder ebenso wie Bären, Füchse oder Koyoten. Die Infektionen der Hasenartigen und Nager mit *F. tularensis* verursachen einen dramatischen Krankheitsverlauf. Gewöhnlich werden die infizierten Tiere moribund oder tot gefunden. Auch verschiedene Vögel ebenso wie Fische und Amphibien zählen zu den Wirten. Weitere Vektoren der Übertragung sind Zecken, Flöhe und Moskitos.
Eine Vielzahl von PCR-Methoden wurde zum Nachweis von *F. tularensis* in klinischen und Umweltproben etabliert. Zum Spezies-Nachweis nutzten wir den PCR-Assay, der das tul4-Gen, das ein 17 kDa Membran-Protein kodiert, als Zielsequenz hat. Die Differenzierung der Typ A-Stämme erfolgte mit der PCR, die auf der pdpD2-Sequenz basiert. Zur spezifischen Identifikation und Abgrenzung von Typ B-Isolaten (*F. tularensis* ssp. *holarctica*) nutzten wir das Primerpaar FtC1/FtC4, das ein spezifisches Amplikon von 300 bp liefert (Johannson et al. 2000).
Im Jahre 2006 wurde die Tularämie bei einem Feldhasen (*Lepus europaeus*) in Thüringen festgestellt. Der Erreger *F. tularensis* ssp. *holarctica* wurde durch Kultivierung, Gramfärbung, Agglutinationstest, partielle DNA-Sequenzierung und mehrere PCRs sowie Erythromycin-Empfindlichkeit/-Resistenz charakterisiert. Dies ist der erste Tularämiefall und die erste Erregerisolierung für Thüringen.
Die steigende enzootische Aktivität von *F. tularensis* in den endemischen Regionen in Zentraleuropa zeigt, dass Tularämie zu den „re-emerging"-Erkrankungen gehört. Der Einfluss des Treibhauseffektes und der zu beobachtende Klimawandel in Zentraleuropa haben einen entscheidenden Einfluss auf die zukünftige Verbreitung der Tularämie und ihre stabile Etablierung in endemischen Gebieten. Somit besteht ein zunehmendes Risiko für Wild- und Haustiere sowie den Menschen. Damit ist das Ziel zukünftiger Untersuchungen die Charakterisierung der Epidemiologie der Tularämie in ganz Europa.

Weitere Projekte

Aufbau einer Stammsammlung aus *Francisella tularensis*-Isolaten verschiedener Regionen Europas
Otto, P. und Müller, W.

Molekularbiologische Differenzierung und Typisierung von *Francisella tularensis*-Isolaten
Müller, W. und Otto, P.

Untersuchung von Zellkulturüberständen und Kotproben auf Viruspartikel
Liebler-Tenorio, E.M. und Otto, P.

3.5 MYKOBAKTERIEN

3.5.1 Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine zyklische Allgemeinerkrankung warmblütiger Tiere und des Menschen, die durch Mykobakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) hervorgerufen wird. Die Erreger besitzen ein breites Wirkspektrum und können vom Tier auf den Menschen, aber auch vom Menschen auf das Tier übertragen werden. Die Tuberkulose ist durch eine chronisch-granulomatöse Entzündung, zunächst des Lymphknotens nahe der Eintrittsstelle (Primärherd) charakterisiert. Im weiteren Verlauf der Erkrankung können einzelne, dem Primärherd benachbarte Organe oder, bei ungünstiger Resistenzlage des Patienten,

mehrere Organe betroffen sein. Bei günstigem Verlauf kann der Erreger auch über Jahre abgekapselt an der Eintrittsstelle überdauern, ohne dass es zu einer klinischen Erkrankung kommt. Seine Infektionsfähigkeit kann jedoch erhalten bleiben, so dass die Krankheit auch nach Jahren der Latenz zum Ausbruch kommen kann. Die Mykobakterien des MTC haben sich im Laufe der Evolution an bestimmte Wirtstierarten bzw. den Menschen angepasst, bei welchen sie als Krankheitserreger von besonderer Bedeutung sind. Ihre Eigenschaften als Zoonose-Erreger versetzen sie jedoch in die Lage, auch bei anderen als ihren Primärwirten Erkrankungen auszulösen.

Verbesserung der molekularen Diagnostik der Tuberkulose beim Rind und anderen Säugern
Moser, I.*, Bauer, K. und Hotzel, H.

Die Tuberkulose des Rindes ist in Deutschland seit vielen Jahrzehnten getilgt. Dennoch werden jedes Jahr einige Fälle von Rindertuberkulose registriert. Die Diagnosestellung auf der Basis der Kultivierung des Erregers, bis heute aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode als „Goldstandard" angesehen, hat den Nachteil, dass mehrere Wochen vergehen können, bevor ausreichend Koloniematerial für eine exakte Diagnosestellung vorhanden ist. Letztere geschieht heute überwiegend mit molekularen Methoden wie PCR und Spoligotypisierung. Um die Diagnostik zu beschleunigen, kann der Nachweis von erregerspezifischer DNA mit Hilfe der PCR direkt aus infiziertem Gewebe geführt werden. Diese Methode kann die Kultivierung nicht ersetzen, sie kann jedoch die Zeitdauer bis zu einer zumindest vorläufigen Diagnose auf wenige Tage reduzieren. Außerdem kann DNA von nicht mehr vermehrungsfähigen Erregern nachgewiesen werden. Der größte Nachteil der Methode liegt in der Gefahr, falsch positive Ergebnisse zu erhalten. Daher wird ein positives PCR-Ergebnis durch Sequenzanalyse des PCR-Produktes bestätigt.
In einer Feldstudie, die noch nicht abgeschlossen ist, wird eine Methode zum Direktnachweis erprobt. Die Extraktion der DNA aus infiziertem Gewebe wird mittels eines kommerziell erhältlichen Kits durchgeführt. Für den Nachweis von DNA, die auf das Vorhandensein von Tuberkulose-Erregern (MTC) hinweist, wird eine im Hause entwickelte nested PCR auf der Basis einer in der Literatur beschriebenen Methode (Rodriguez et al., 1995) angeschlossen. Die Sensitivität der Nachweismethode wurde mittels einer kommerziell erhältlichen *real-time* PCR bestimmt. Weniger als 1.000 Genomeinheiten pro 25 mg Gewebematerial konnten spezifisch nachgewiesen werden. Ein Projekt zur Evaluierung der kommerziellen *real-time* PCR ist in Vorbereitung.
Die Spezifität der Nachweisprozedur wurde bisher mit insgesamt 22 Mykobakterienspezies überprüft. Falsch positive Ergebnisse waren nicht nachweisbar. Auch die Anwendung in der Feldstudie erbrachte bisher keine falsch positiven Ergebnisse. Weitere Untersuchungen zielen auf eine Steigerung der Sensitivität durch Optimierung des Gewebeextraktionsverfahrens ab. Wichtig für die Untersuchungen war, dass nur Feldproben mit „gewachsener" Tuberkulose in diese Untersuchung mit einbezogen wurden, da die Gewebekonsistenz und die Lokalisation des Erregers im entzündlich-granulomatös veränderten Gewebe nicht mit der Situation einer künstlich kontaminierten, im übrigen aber unveränderten Gewebeprobe vergleichbar sind.

***Mycobacterium (M.)-tuberculosis*-Infektionen bei Haustieren – drei außergewöhnliche Fälle**
Moser, I.*, Peters, M., Deppenmeier, S., Bisenbach, W., Möbius, P. und Prodinger, W.

Tuberkulose kann durch engen Kontakt vom Menschen auf das Haustier und umgekehrt übertragen werden. Säugerspezies und auch bestimmte Vogelarten können sich mit Säugertuberkulose infizieren. In den drei im Folgenden dargestellten Fällen wurde keiner der überwiegend beim Tier vorkommenden Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes (MTC; *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*) nachgewiesen, sondern der Erreger der Tuberkulose des Menschen, *M. tuberculosis*. Dies bedeutet aller Wahrscheinlichkeit nach, dass die Infektion nicht vom Tier auf den Menschen, sondern vom Menschen auf sein Haustier übertragen wurde. In zwei der drei Fälle war beim Tierbesitzer aktuell oder in der jüngeren Vergangenheit eine Tuberkulose diagnostiziert worden.
Bei einer moribunden Blaustirnamazone (*Amazona aestiva aestiva*) wurde eine generalisierte Tuberkulose festgestellt. Pathohistologisch wurden ausgeprägte granulomatöse Veränderungen in verschiedenen Organen (u. a. Lunge, Haut, Muskelmagen und Zunge) vorgefunden. MTC-DNA wurde direkt in infiziertem Gewebe nachgewiesen und *M. tuberculosis* konnte aus diesen Geweben angezüchtet werden. Die Untersuchung der Isolate des Vogels und der Besitzer mittels Spoligotypisierung und MIRU (mycobacterial interspersed repetitive unit)-Typisierung ergab, dass die Isolate aus beiden Quellen identische Charakteristika aufwiesen.

Bei einem sechs Jahre alten Golden Retriever (*Canis familiaris*), der an Atembeschwerden litt, wurden durch Röntgenuntersuchungen Schatten auf der Lunge festgestellt, wie sie für Tuberkulose typisch sind. Nach der Euthanasie des Tieres wurden Granulome in Lungen, Lungenlymphknoten und Nebennieren gefunden. Auch die histologischen Veränderungen waren mit dem Vorliegen einer Tuberkulose vereinbar. *M. tuberculosis* wurde nachgewiesen.
Der dritte Tuberkulosepatient war ein etwa 30 Jahre altes Pony (*Equus caballus*), bei dem im Verlauf der Obduktion multiple weißliche linsengroße Knötchen in den Lungen und histologisch multiple granulomatöse Herde gefunden wurden. *M. tuberculosis* wurde isoliert. In diesem Fall war die Tuberkulose jedoch nicht die primäre Todesursache.
Die beschriebenen Fälle zeigen, dass vom Menschen ausgehende Tuberkulose-Infektionen bei Haustieren selten, aber nicht ausgeschlossen sind. Diese Tiere können den Erreger wiederum verbreiten und stellen somit ein besonders hohes Infektionsrisiko für ihre Umgebung dar. Molekulare Typisierung leistet einen unverzichtbaren Beitrag bei der Abklärung der Infektionswege.

Weitere Projekte

Ultrastrukturelle Untersuchung von *Mycobacterium* spp. nach verschiedenen Aufarbeitungsmethoden
Liebler-Tenorio, E.M., Moser, I. und Rohrmann, B.

3.5.2 Paratuberkulose

Die Paratuberkulose ist eine chronische entzündliche Darmerkrankung der Haus- und Wildwiederkäuer, die durch *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. Ihre erste wissenschaftliche Beschreibung erfuhr die Krankheit durch Johne und Frothingham bei einer Milchkuh aus dem Raum Oldenburg im Jahre 1895.
Die Meldedaten zeigen, dass die Paratuberkulose in Deutschland mittlerweile flächendeckend verbreitet ist. Verlässliche Schätzwerte zur Prävalenz auf Herdenebene gibt es jedoch nicht. Auf Grund der komplexen Pathogenese der Erkrankung und der individuellen Reaktionslage der betroffenen Einzeltiere gestaltet sich die *Intra-vitam*-Diagnostik der Erkrankung äußerst schwierig. Sowohl die Methoden zum direkten Erregernachweis als auch zum Nachweis von Antikörpern weisen nur eine begrenzte Sensitivität auf.
Bereits seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wird eine Bedeutung von MAP in der Pathogenese des Morbus Crohn, einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung des Menschen, diskutiert. Ein endgültiger Beweis für den zoonotischen Charakter der Paratuberkulose steht jedoch noch aus.

Evaluation eines Flüssigkultursystems zur kulturellen Anzüchtung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Kotproben von Rindern
Köhler, H.* und Gierke, F.

Ein wichtiger Faktor bei der Sanierung der Paratuberkulose in Milchviehbeständen ist die frühzeitige Erkennung und Eliminierung von Ausscheidern, da nur so der Infektionsdruck in der Herde gesenkt werden kann. Die kulturelle Anzüchtung auf festen Nährmedien, die bisher dafür die Standardmethode darstellt, findet auf Grund der langen Dauer bis zum Vorliegen eines Ergebnisses und des hohen Arbeitsaufwandes in der Praxis nur begrenzte Akzeptanz. Als Alternative bietet sich der Direktnachweis von MAP in Kotproben mittels PCR oder die kulturelle Anzüchtung mittels automatisierter Flüssigkultursysteme an.
In einer Studie wurde die Effektivität der kulturellen Anzüchtung von MAP in einem kommerziellen automatisierten Flüssigkultursystem (BACTEC MGIT 960 paraTB System) mit der herkömmlichen Kultur auf HEYM-Nährmedium mit Mycobactin J (HEYM-MJ) verglichen. Das Flüssigmedium besteht aus einer modifizierten Middlebrook-Bouillon mit Zusatz von Eigelb, OACC, Mycobactin J und einer Antibiotikum-Mischung (Amphotericin B, Nalidixinsäure, Vancomycin - ANV). Der Nachweis von bakteriellem Wachstum erfolgt unspezifisch durch Anzeige des O_2-Verbrauches mit Hilfe einer fluoreszierenden Indikatorsubstanz. Aus diesem Grund macht sich ein zweiter Schritt zur Spezies-Identifikation (Prüfung des Mycobactin-abhängigen Wachstums oder PCR) notwendig.
Bei der Flüssigkultur wurde z. T. ein hoher Anteil an falsch-positiven Signalen verzeichnet, der nicht durch eine bakterielle oder Pilzkontamination der Kulturen bedingt war. Durch ein zweistufiges Dekontaminationsverfahren (24 h 0,9 % HPC in 1/2 Hirn-Herz-Bouillon bei 37 °C, Zentrifugation, 24 h

ANV bei 37°C) konnte der Anteil an Kontaminationen und an falsch positiven Signalen reduziert werden. In der Flüssigkultur waren häufiger andere im Kot vorkommende Mykobakterien nachweisbar als bei der Festkultur auf HEYM-MJ. Die Nachweisraten von Flüssig- und Festkultur waren vergleichbar, es wurden jedoch teilweise unterschiedliche Proben als positiv erkannt. Die Durchführung des vom Hersteller vorgegebenen Testprotokolls war sehr arbeitsintensiv. Da die Speziesidentifikation durch Subkultivierung zum Nachweis der Mykobaktin-Abhängigkeit erfolgte, erbrachte das automatisierte Flüssigkultursystem nur eine unwesentliche Zeitersparnis. Für den Routine-Einsatz ist eine weitere Optimierung des Verfahrens notwendig. Zum derzeitigen Zeitpunkt kann damit die Kultur auf festen Nährmedien nicht ersetzt werden.

Validierung eines Milch-ELISA zur Einzeltierdiagnose der Paratuberkulose bei Milchrindern

Köhler, H.*, Gierke, F., Möbius, P. und Ziller, M.

Der Nachweis von Antikörpern gegen MAP bildet nach wie vor eine wichtige Säule der Paratuberkulose-Diagnostik in Milchviehbetrieben. Die Entnahme von Blutproben bringt jedoch vor allem in großen Beständen einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand und eine erhebliche Störung des Arbeitsablaufes mit sich. In einer Feldstudie sollte überprüft werden, inwieweit der Antikörpernachweis in Serumproben durch die Untersuchung von Milchproben ersetzt werden kann. In drei großen Milchviehbeständen wurden Blutserum und Milch parallel von den Kühen gewonnen und mit zwei verschiedenen ELISA (Institut Pourquier, SVANOVA) vergleichend untersucht.
Während beim ELISA des Institut Pourquier eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse von Blut- und Milchproben zu verzeichnen war, traten beim SVANOVA-Test deutliche Abweichungen der Ergebnisse in beiden Probenmatrizes zutage. Für die Untersuchung von Milchproben kann nur der Pourquier-ELISA empfohlen werden.
Die zugelassenen serologischen Tests auf Paratuberkulose-Antikörper sind durch sehr geringe Sensitivitäten gekennzeichnet. Die alternative bakteriologische Kotuntersuchung ist kostenintensiv und zeitaufwändig. Eine Erhöhung der Sensitivität der Einzeltierdiagnostik scheint nur durch mehrfach wiederholte Testung möglich zu sein. Deshalb sollte im Rahmen der o. g. Studie außerdem die Aussagefähigkeit verschiedener Testsysteme bei Einfach- und Mehrfachtestung verglichen werden. Erste Ergebnisse zeigen, dass eine verlässliche Statusbestimmung für Einzeltiere nur durch mehrfach wiederholte Kotuntersuchung erreicht werden kann.

Vergleich verschiedener Methoden zur Direktisolierung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-DNA aus Rinderkot

Möbius, P.*, Gloria, A. und Köhler, H.

Ein generelles Problem bei der Nutzung der PCR in der Routinediagnostik stellt die Sensitivität der Direktisolierung dar. Sie wird erschwert durch das Auftreten von MAP in Klumpen, das phasische Vorkommen von MAP im Kot in Abhängigkeit vom jeweiligen Krankheitszustand des Tieres, die Komplexität der Proben mit hohem inhibitorischem Potential für die PCR und das geringe Ausgangsprobenvolumen, aus welchem letztendlich isolierte MAP-DNA in die PCR gelangt.
Fünf verschiedene Methoden zur DNA-Direktisolierung aus Kot, bestehend aus kommerziellen „Kits“, wurden miteinander verglichen. Als Untersuchungsmaterial wurde frischer Rinderkot von drei Paratuberkulose-unverdächtigen Tieren mit vier verschiedenen Verdünnungen einer MAP-Suspension versetzt. Nach der DNA-Isolierung wurde MAP mittels PCR (Englund et al., 1999) detektiert. Am sensitivsten war der QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) gefolgt vom Adiapure® Kit (ADIAGENE). Für drei weitere Isolierungsmethoden (PSP Spin Stool DNA Plus Kit von Invitek, Guanidinhydrochlorid/ Wizard® Clean Up Resin von Promega und peqGOLD TriFast™ von peqlab) wurde ein zusätzlicher DNS-Reinigungskit benötigt, um PCR-Inhibitoren zu beseitigen. Danach war die Sensitivität des PSP Spin Stool DNA Plus Kit (Invitek) vergleichbar mit der des Adiapure® Kit (ADIAGENE). PeqGOLD TriFast™ schnitt am schlechtesten ab. Umfassendere Untersuchungen mit Feldproben sollen die bisherigen Ergebnisse vervollständigen und mit der Kotkultur vergleichen.

Identifizierung von Mykobakterien in Milchfiltern und im Kot verschiedener Milchrinderherden aus Deutschland

Möbius, P.*, Helbing, H., Gottschaldt, J., Hotzel, H. und Köhler, H.

Kenntnisse über das Vorkommen verschiedener Mykobakterien beim Rind geben Hinweise für die Anforderungen an diagnostische Tests. Im Rahmen einer Studie wurden verschiedene Mykobakterien in Milchfilter- und Kotproben von Milchrinderbetrieben, die an Paratuberkulose-Kontrollprogrammen teilnehmen, identifiziert. MAP-Ausscheider werden aus diesen Herden regelmäßig entfernt. Von 100 untersuchten Milchfiltern aus mehreren Thüringer Betrieben konnten in 32 Fällen Mykobakterien isoliert werden. Nach der Subkultivierung wurden die Mykobakterien mittels PCR, PCR-REA und zum Teil durch Sequenzierung differenziert. Neben MAP ließen sich sechs verschiedene atypische Mykobakterienspezies bestimmen: *Mycobacterium* (*M.*) *fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. abscessus, M. chelonae, M. phlei* und *M. avium subsp. hominissuis*. In Kotproben von Milchrindern aus verschiedenen Regionen Deutschlands konnten 18 verschiedene Mykobakterienspezies identifiziert werden. Zusätzlich zu den schon aus den Milchfiltern isolierten Spezies wurden u. a. *M. terrae*, *M. porcinum* und *M. kansasii* nachgewiesen. Die Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit der Spezifitätsprüfung von diagnostischen Nachweismethoden für die Paratuberkulose.

Zytokinreaktionen humaner Monozyten nach Interaktion mit MAP und mit isolierten Zellwandbestandteilen von MAP

Borrmann, E.*, Gierke, F. und Köhler, H.

Die Bedeutung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) als Zoonoseerreger wird in zahlreichen Veröffentlichungen kontrovers diskutiert. Zwar weist die Crohn'sche Erkrankung des Menschen in ihrem Krankheitsbild Ähnlichkeiten mit der Paratuberkulose beim Rind auf, ein ätiologischer Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn konnte jedoch bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Erschwerend wirkt dabei die Tatsache, dass die Pathomechanismen der Paratuberkulose selbst noch weitgehend ungeklärt sind. Anerkannt ist, dass die Aufnahme von MAP in intestinale (subepitheliale) Makrophagen sowie das Überleben und die Vermehrung des Erregers in den Makrophagen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese darstellen. Die phagozytierten Bakterien aktivieren eine Reihe von Signaltransduktionswegen in den Wirtszellen, die u. a. zur Bildung von Zytokinen und reaktiven Stickstoffprodukten führen. Diese Produkte wiederum beeinflussen die Kommunikation zwischen Makrophagen und weiteren Wirtszellen, insbesondere T-Zellen. Biologisch aktive Zellwandbestandteile wie Lipoarabinomannan (LAM) sind an diesen Prozessen beteiligt.

Ziel unserer Arbeiten war zu untersuchen, welche Antworten bovine MAP-Isolate nach Internalisierung in humanen Makrophagen induzieren. Dazu wurde ein Zellkulturassay unter Verwendung der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 etabliert und die für eine standardisierte Durchführung des Zelltests notwendigen Parameter bestimmt. Nach Stimulierung mit Phorbolmyristatacetat (PMA) differenzieren die humanen Monozyten zu adhärenten Makrophagen.

Für die Untersuchungen wurden sowohl lebende MAP-Kulturen als auch gereinigtes LAM von MAP und *M. smegmatis* eingesetzt. In umfangreichen Voruntersuchungen wurde eine Methode zur Vereinzelung von MAP entwickelt. Eine Korrelation zwischen optischer Dichte der Bakterienkultur und den mittels Plattenzählung ermittelten koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde so erreicht. Die Bestimmung der Infektionsrate der Makrophagen nach Inkubation mit MAP in Abhängigkeit von der Inkubationszeit erfolgte mittels Fluoreszenzfärbung.

Als Parameter für die Wechselwirkung zwischen MAP und Makrophagen wurden die Zytokine IL-1, IL-6 und IL-10 bestimmt. Auf Genexpressionsebene erfolgte der Nachweis mittels PCR und quantitativer *real-time* PCR, die Bestimmung der biologisch aktiven Zytokine in den Zellkulturüberständen mittels ELISA. Erste Ergebnisse zeigen, dass sowohl IL-1 als auch IL-10 mRNA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der optischen Dichte induziert werden. LAM induziert IL-1 und IL-10 mRNA in Abhängigkeit von der Konzentration. IL-6 konnte nur nach Inkubation der Makrophagen mit MAP-Kulturen hoher Keimzahl (OD>0.1) und einer Inkubationszeit von 24 h nachgewiesen werden.

Weitere Projekte

Einarbeitung und Validierung von direkten und indirekten Methoden zur Diagnostik der Paratuberkulose
Köhler, H. und Möbius, P.

Molekulare Epidemiologie von *M. avium* ssp. *paratuberculosis*
Möbius, P. und Köhler, H.

Pathogenese der Paratuberkulose und chronischer entzündlicher Darmerkrankungen
Borrmann, E. und Köhler, H.

3.6 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 Tierart-adaptierten *Salmonella*-Serovaren sind häufig auch virulente nicht-Tierart-adaptierte 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 Infektionen des Menschen.

Zum Vorkommen von Salmonellen bei Legehennen in unterschiedlichen Haltungsformen und Schlussfolgerungen für die Bekämpfung
Methner, U.*, Diller, R., Reiche, R. und Böhland, K.

Aufgrund der nach wie vor besonderen Bedeutung des von Konsumeiern ausgehenden Risikos für *Salmonella*-Infektionen des Menschen und der gegenwärtig erfolgenden Verschiebung der Haltung von Legehennen von der konventionellen Käfighaltung zu alternativen Systemen sollte im Rahmen der durchgeführten Studie untersucht werden, ob die *Salmonella*-Besiedelung bei Legehennen durch die Haltungsform beeinflusst wird. Dabei wurden folgende Haltungssysteme berücksichtigt: Bio-Freilandhaltung, Bodenhaltung mit Auslauf, Bodenhaltung ohne Auslauf, Käfighaltung. Insgesamt wurden 453 Sammelkotproben als Einzel- oder Wiederholungsuntersuchung von 329 Herden unterschiedlicher Haltungssysteme zur Konsumeier-Produktion aus drei Bundesländern kulturell bakteriologisch untersucht und in der Auswertung berücksichtigt.
Der Anteil der Legehennen-Herden, die mindestens zu einem Untersuchungszeitpunkt einen positiven *Salmonella*-Befund aufwiesen, betrug insgesamt 32,2 %. Die Aufschlüsselung der *Salmonella*-Befunde nach den einzelnen Haltungssystemen ergab, dass der Anteil S*almonella*-positiver Herden in der konventionellen Käfighaltung höher war (46,3 %) als in den alternativen Haltungsformen (32,9 % Bio-Freilandhaltung, 21,9 % Bodenhaltung mit Auslauf, 23,4 % Bodenhaltung ohne Auslauf). Die Ergebnisse der Studie belegen eindeutig, dass *Salmonella Enteritidis* (vorwiegend Phagentyp 4, andere Phagentypen selten) insgesamt mit einem Anteil von 78 % die größte Bedeutung bei Legehennen besitzt. Andere Serovaren (außer *Salmonella Enteritidis* und Subspezies I Rauhform) hatten insgesamt einen Anteil von 14 %, wobei jedoch keine andere einzelne Serovar dominierte.
Da *Salmonella Enteritidis* die größte Bedeutung bei Legehennen besitzt, sollte im Rahmen der Immunisierungsprogramme im Aufzuchtbereich auch gegen diese Serovar homolog immunisiert werden. Aufgrund der hohen *Salmonella*-Nachweisraten bei Legehennen in allen untersuchten Haltungsformen sind detaillierte Kenntnisse über die Epidemiologie von Salmonellen in den infizierten Herden erforderlich, um effektive Bekämpfungsverfahren zu etablieren. Von besonderem Interesse ist dabei die Frage, ob die *Salmonella*-Nachweise bei Legehennen das Ergebnis einer Vermehrung bereits vorhandener Salmonellen bei den Tieren sind oder ob es sich um einen neuen *Salmonella*-Eintrag in die Herde handelt.

***Salmonella* Choleraesuis bei Wildschweinen in Thüringen – epidemiologische Aspekte**
Methner, U.*, Bocklisch, H., Plötner, J. und Heller, M.

In Thüringen wurde im Zeitraum von 2001 bis 2005 aus vierzehn Wildschweinen, drei Hausschweinen und einem Dachs *Salmonella* Choleraesuis (SCS) isoliert. Die Wildschweine, ausschließlich Jungtiere, wurden als verendetes Fallwild und als geschossenes Wild eingeschickt. Die Herkunft der SCS-positiven

Tiere konzentrierte sich auf Südthüringen bzw. Mittel- und Nordthüringen, die durch das Gebirge Thüringer Wald getrennt sind. Bei zwölf Wildschweinen und dem Dachs waren bei der Sektion septikämische Veränderungen vorzufinden.
Die isolierten SCS-Stämme wurden mittels Plasmidprofilanalyse, Makrorestriktionsanalyse, REP-PCR, ERIC-PCR sowie durch das Antibiotika-Resistenzmuster näher charakterisiert. Durch die Makrorestriktionsanalyse wurde deutlich, dass die SCS-Isolate aus Südthüringen zu einer anderen genetischen Gruppe gehören als die Stämme aus Mittel- bzw. Nordthüringen. Die Isolate vom Hausschwein konnten der Gruppe zugeordnet werden, die auch bei Wildschweinen in der Region festgestellt wurde. Ein direkter Zusammenhang zwischen Haus- und Wildschweinpopulation besteht aber vermutlich nicht, da Unterschiede im Resistenzmuster der Isolate auftraten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die SCS-Isolate von Wildschweinen über längere Zeiträume in größeren Regionen persistieren können und dass ein Austausch von Klonen durch Gebirge oder Verkehrswege einschränkt wird. Zum Nachweis möglicher Infektketten zwischen der Wild- und Hausschweinpopulation sind molekulare Methoden geeignet und notwendig.

Zur Methodik der bakteriologischen Untersuchung nach Rinder-Salmonellose-Verordnung
Methner, U.*

Im Unterschied zur Standard-Methode ISO 6579 wird die bakteriologische Untersuchung von Kotproben nach Rinder-Salmonellose-Verordnung ohne Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser durchgeführt. Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Kotproben vom Geflügel zeigten, dass bei Verwendung der Voranreicherung sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Die angestrebte Modifikation der Methode ISO 6579 für Untersuchungsmaterial tierischen Ursprungs besteht darin, dass die beiden flüssigen Selektivmedien durch das modifizierte halbfeste Rappaport-Vassiliadis-Medium (MSRV) ersetzt werden. Da noch keine Untersuchungsergebnisse zum Nachweis von Salmonellen aus Kotproben vom Rind mit dieser Methodik verfügbar sind, wurden die *Salmonella*-Nachweisraten aus Kotproben mit und ohne Voranreicherung verglichen. Darüber hinaus wurden Kotproben mit *Salmonella*-Wild- und Impfstämmen artifiziell infiziert. Bei den mit geringen Keimkonzentrationen kontaminierten Proben konnten die *Salmonella*-Stämme nach Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser reisoliert werden, während sie bei direkter Inokulation in flüssigen Selektivmedien nicht nachgewiesen wurden. Bei den Kottupfern von Rindern war die Nachweisrate nach Voranreicherung um ca. 20 % höher als nach direkter Anzucht in Selektivmedien. MSRV erwies sich auch bei Kotproben vom Rind als geeignetes Selektivmedium. Da die Identifizierung der *Salmonella*-ausscheidenden Rinder sehr wichtig für die Sanierung des Bestandes ist, sollten die Möglichkeiten einer Modifizierung der gültigen Methodik diskutiert werden.

Epidemiologie und molekulare Charakterisierung von *Salmonella*-Paratyphi B *d*-Tartrat$^+$ in Geflügelmastbeständen
Reiche, R.* und Methner, U.

Vor 1990 wiesen *d*-Tartrat-positive Stämme von *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Serovar Paratyphi B eine große genetische Vielfalt auf. Seit Mitte der 90er Jahre dominiert in Geflügelmastbeständen und Geflügelprodukten eine neue Gruppe von Stämmen, die auf eine klonale Linie des Erregers zurückzuführen ist. Insbesondere in den Niederlanden, aber auch in Deutschland, wurde eine starke Ausbreitung von Stämmen dieses *d*-Tartrat-positiven *Salmonella* Paratyphi B-Klons in Geflügelmastbeständen festgestellt. Das Auftreten humaner Infektionen in Schottland im Jahre 2002 zeigte, dass die Virulenz dieser Serovar auch für den Menschen nicht zu unterschätzen ist.
In unseren Untersuchungen wurden die Möglichkeiten zur Feindifferenzierung von *d*-Tartrat-positiven *Salmonella*-Paratyphi B-Stämmen durch phäno- und genotypische Methoden geprüft. Isolate aus verschiedenen Geflügelmastbeständen aus den Jahren 2002 und 2003 wurden durch ihr Makrorestriktionsmuster, Plasmidprofil, Antibiogramm und den „Substracted Restriction Fingerprint" (SRF) charakterisiert (Terletski et al., 2003, Microbiol. Res. **158**:135-142).
Zur Differenzierung der Isolate von *Salmonella*-Paratyphi B *d*-Tartrat$^+$ waren die Typisierungsmethoden von unterschiedlicher Aussagekraft. Durch die Makrorestriktionsanalyse wurde deutlich, dass alle Isolate zu der seit Mitte der 90er Jahre in Deutschland dominierenden, klonalen Linie des Erregers gehören. Alle Stämme zeigten mit den Restriktionsenzymen *Xba*I, *Spe*I und *Bln*I einheitliche Makrorestriktionsmuster. Die Methode ermöglichte keine weitere Unterscheidung der Isolate. Zur Differenzierung geeignet war dagegen die Plasmidanalyse mit einem diskriminatorischen Index *(D)* von 0,87 und das Antibiotika-

resistenzprofil der Isolate. Die SRF–Methode erwies sich als hochdiskriminatives Verfahren zur Unterscheidung von Stämmen der klonalen Linie von *Salmonella*-Paratyphi B *d*-Tartrat$^+$. Diese Methode war der Makrorestriktionsanalyse deutlich überlegen. Die Kombination von Plasmidprofil, Antibiotika-resistenzmuster und SRF ermöglichte die Feindifferenzierung des *d*-Tartrat-positiven *Salmonella* Paratyphi B-Klons und somit die Untersuchung von Übertragungswegen dieser Serovar in den Geflügelmastbetrieben. Es konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Hallen der Mastbetriebe die *d*-Tartrat-positiven Paratyphi B-Isolate während der gesamten Beprobungszeit das gleiche Antibiogramm sowie Plasmid- und SRF-Profil aufwiesen, während in anderen Hallen ein Austausch von Stämmen des Erregers stattfand.
Die vorgestellten Ergebnisse belegen, dass der *Salmonella*-Status der Hallen zum Zeitpunkt der Einstallung der Küken als wesentlicher Risikofaktor für persistierende Infektionen in den Hallen betrachtet werden muss.

Weitere Projekte

Epidemiologische Untersuchungen zu einer Salmonellen-Epidemie bei Diensthunden
Schotte, U. und Geue, L.

Salmonellen-Status bei Schlachtschweinen, Befunderhebung mit bakteriologischen und serologischen Methoden
Methner, U. und Rammler, N.

Salmonella-free broilers by live vaccine-induced innate resistance to colonisation and invasion and novel methods to eliminate vaccine and field strains
Methner, U., Berndt, A., Haase, A. und Pieper, J.

Entwicklung eines Microarrays zur Transkriptionsanalyse von Virulenz-assoziierten Genen bei Salmonellen
Müller, J. und Methner, U.

Einfluss von antikörperhaltigem Eipulver auf das Adhäsions- und Invasionsvermögen von Salmonellen *in vitro*
Methner, U. und Friedelt, I.

Untersuchungen zu immunologischen Abwehrmechanismen des Geflügels bei *Salmonella*-Infektionen
Berndt, A., Pieper, J. und Methner, U.

3.7 S3-ERREGER

In der Arbeitsgruppe „S3-Erreger“ sind die nationalen Referenzlaboratorien für Brucellose, Milzbrand und Rotz zusammengefasst. Außerdem nimmt das NRL für Brucellose gleichzeitig die Funktion als O.I.E. Referenzlabor wahr. Hauptaufgabe aller NRL ist die Erweiterung des Methodenspektrums zum mikrobiologischen und serologischen Erregernachweis und Anpassung an neueste wissenschaftliche Erkenntnisse. Ein besonderer Schwerpunkt ist die Entwicklung eines diagnostischen DNA-Microarrays für den schnellen und simultanen Nachweis von S3-Erregern.

Entwicklung eines diagnostischen DNA-Microarrays für den schnellen und simultanen Nachweis von S3-Erregern
Schmoock, G.*, Ehricht, R., Melzer, F., Raßbach, A. und Elschner, M.

Das Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines diagnostischen DNA-Microarrays für den schnellen und simultanen Nachweis der S3-Erreger *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus anthracis* und *Brucella spp*. Für einen leichten und verlässlichen Einsatz in der Routinediagnostik soll ein ‚Low-Density'-Tube-Microarray (ArrayTube™ System, AT) verwendet werden.
Im Fall von *Burkholderia* wurden das 16S rDNA- und das *flic*-Gen für den Nachweis des Genus *Burkholderia* bzw. für die Identifizierung des *B. mallei*/*pseudomallei*-Komplexes verwendet. In Anbetracht der hohen genetischen Ähnlichkeit von *B. mallei*, des Rotz-Erregers, und *B. pseudomallei*, des Erregers der

Meliodiose, ist die Differenzierung dieser nah verwandten Spezies problematisch. Um neue Target-Gene zu identifizieren, wurden 2.000 Gensequenzen von *B. mallei* mit *B. pseudomallei* Genomsequenzen aus der Genbank *in silico* miteinander verglichen. DNA-Sequenzanalyse ermittelte fünf Gene mit *B. mallei*-spezifischen Sequenzregionen, die sich auch für die Generierung von Oligo-Sonden eignen. Vier dieser neuen Target-Regionen wurden mittels PCR untersucht, wobei 19 *B. mallei*, 25 *B. pseudomallei* und acht nah verwandte *Burkholderia*-Spezies analysiert wurden. Die PCR-Analyse ergab, dass zwei dieser Zielregionen *B. mallei* und *B. pseudomallei* eindeutig differenzieren können. Die beiden anderen Regionen zeigten eine Spezifität von 92% bzw. 84%.
Für *Brucella* wurden elf Gene für den Nachweis des Genus *Brucella* sowie die Identifizierung der Spezies *B. suis*, *B. abortus* und *B. melitensis* als Zielregionen verwendet. Neben den bereits gut charakterisierten diagnostischen Marker-Genen *bcsp31* und *omp2b* wurden neun Zielregionen verwendet, welche durch Genom-vergleichende Studien entdeckt wurden und in der Literatur beschrieben sind.
Das Layout eines ersten Evaluierungs-Arrays umfasst Oligo-Sonden für den Nachweis von *Burkholderia*- und *Brucella*-Spezies. Oligo-Sonden für *Bacillus anthracis* wurden nicht mit aufgenommen, da ein AT-Microarray für diesen S3-Erreger bereits als Prototyp existiert. Für das Pilot-Array wurden 82 Oligo-Sonden entworfen, synthetisiert und mit dreifacher Redundanz gespottet. Um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten, wurden Primer für die Amplifikation der verschiedenen chromosomalen Zielregionen entworfen. Durch die Verwendung von 5'-biotinylierten Primern werden die Amplicons markiert und lassen sich nach der Hybridisierung mit Hilfe eines Streptavidin-HPR-Konjugats durch eine HPR-katalysierte Farbreaktion visuell detektierten.
Die ersten Experimente wurden mit Referenzstämmen durchgeführt. Aufgrund des hohen GC-Gehalts der *Burkholderia*-Gene wurden nur schwache Hybridisierungssignale erhalten und die Hybridisierungsbedingungen mussten optimiert werden. Es wurden verschiedene Hybridisierungspuffer-Additive getestet, um die Bildung von Sekundärstrukuren zu reduzieren. Es zeigte sich, dass eine finale Konzentration von 7,5% DMSO die Signalintensität signifikant erhöhte. Unter diesen Hybridisierungs-bedingungen werden nun weitere Referenzstämme getestet und die Spezifität der einzelnen Oligo-Sonden untersucht.
Nach der Validierung des Pilot-Microarrays kann das Sonden-Set für den Nachweis weiterer Erreger erweitert werden.

3.7.1 Brucellen

Die Brucellose ist eine zoonotische Infektionskrankheit, die durch Bakterien der Gattung *Brucella* (*B.*) hervorgerufen wird. Die Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen ist eine anzeigepflichtige Tierseuche. Hauptsymptome sind Aborte, Frühgeburten oder die Geburt toter, lebensschwacher und unterentwickelter Tiere. Beim männlichen Tier kommt es meist zu entzündlichen Veränderungen im Bereich des Genitaltraktes, v. a. der Hoden und Nebenhoden. Beim Menschen verursacht die Brucellose eine influenzaähnliche Symptomatik mit Fieber, Glieder- und Rückenschmerzen.

Entwicklung und Etablierung einer *real-time* PCR Methode zum schnellen Nachweis von Brucellen aus verschiedenen Probenmaterialien
Melzer, F. und Tomaso, H.

Ein LightCycler® basiertes PCR-Protokoll zur Identifizierung von *Brucella* spp. wurde zur Anwendung auf einem Taqman®-System modifiziert und im Labor etabliert. Da bei der Etablierung der Methode bisher lediglich Koloniematerial zum Einsatz kam, soll die Primer-Sonden-Kombination im weiteren Verlauf einer Validierungsstudie unterzogen werden. Ziel ist es, eine möglichst hohe Sensitivität und Robustheit der Methode bei Erhalt der notwendigen Spezifität für unterschiedliche Probenmaterialien zu erzielen. Zu den in diesem Rahmen zu untersuchenden Matrices zählen Blut (Vollblut, EDTA-Blut, Serum) und Milch, Organmaterialien (z.B. Plazenta, Hoden) und Tupferproben.

3.7.2 Burkholderia mallei

Burkholderia mallei ist der Erreger des Rotzes (Malleus), einer akut bis chronisch verlaufenden anzeigepflichtigen Infektionskrankheit der Einhufer mit zoonotischem Potential. Die Erkrankung tritt in Teilen Asiens und Südamerikas endemisch auf, gilt in Westeuropa aber als getilgt. Deutschland ist seit 1956 frei von dieser Tierseuche.

Entwicklung und Validierung von serologischen Bestätigungsverfahren für den Nachweis von *Burkholderia mallei*-Infektionen

Elschner, M.*, Melzer, F. und Scholz, H.

Im internationalen Handel werden bei Einhufern serologische Untersuchungen auf Rotz gefordert. Bei der Untersuchung mittels der vorgeschrieben KBR treten weltweit in verschiedenen Laboren Probleme auf. Insbesondere das Ausschließen falsch positiver KBR-Ergebnisse erlangt eine besondere Wichtigkeit. Das NRL arbeitet an der Validierung eines Western Blots, der positive KBR-Ergebnisse verifizieren soll. Die bisher verwendeten Ganzzell-Antigene wurden durch spezifische LPS-Präparationen von *B. mallei*-Referenzstämmen ersetzt. Dadurch konnte die Spezifität des Immunoblots deutlich verbessert werden. Die Sensitivität und die Standardisierbarkeit dieses Verfahrens sollen jedoch weiter optimiert werden. Dazu werden auch rekombinante Antigene auf ihre diagnostische Eignung geprüft. Zukünftig soll außerdem ein kompetetiver ELISA die serologischen Untersuchungsmethoden ergänzen.

3.8 DURCH ZECKEN ÜBERTRAGENE KRANKHEITEN

Natürliche Infektion eines Affen (*Macaca sylvanus*) mit dem Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis

Süss, J.*, Klaus, C., Bagon, A., Liebler-Tenorio, E. und Hotzel, H.
(in Zusammenarbeit mit Gelpi, E., Budka, H. [Institut für Neurologie, Medizinische Universität Wien, Österreich]; Stark, B. [Affenberg Salem, Bodensee, Deutschland])

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) tritt hauptsächlich beim Menschen auf, selten bei Hunden und Pferden, und war bisher bei Affen abseits von Tierexperimenten mit intracerebraler Inokulation des Virus unbekannt.
Wir diagnostizierten den ersten Fall einer FSME beim Affen nach natürlicher Exposition in einem FSME-Hochrisiko-Gebiet, wobei klinische, serologische und neuropathologische Befunde erhoben sowie das Vorkommen von FSME-Virus im Gehirn immunhistochemisch und mittels nRT-PCR nachgewiesen wurden.
Der Affenberg, in dem die Infektion stattfand, befindet sich im Süden Deutschlands, im Bodensee-Kreis. Dieser Kreis ist ein FSME-Risikogebiet, an das sich im Westen ein FSME-Hochrisikogebiet (Kreis Konstanz) anschließt. Zwischen 1999 und 2005 wurden im Bodenseekreis 25 und im Kreis Konstanz 30 humane autochthone klinische FSME-Fälle gemeldet. Die Prävalenz des FSME-Virus in Zecken (*Ixodes ricinus*) lag in diesem Gebiet zwischen 1,2 und 2,3 %.
In einer Gruppe von ca. 200 Affen, die in einer großen Außenanlage gehalten wurden, erkrankte ein weiblicher Berberaffe (*Macaca sylvanus*) mit Taumeln, Parese der Beine, Koordinierungsstörungen und intermittierendem Opisthotonus. Vier Tage nach Auftreten der ersten klinischen Symptome fiel der Affe ins Koma und wurde euthanasiert. Bei der Sektion des Affen waren keine makroskopischen Veränderungen zu sehen.
Moderate perivaskuläre entzündliche Areale und eine diffuse Infiltration des Hirnparenchyms durch mononukleäre Zellen waren in nahezu allen untersuchten Hirnabschnitten zu sehen, auch in den Basalganglien und im Cerebellum. Zusätzlich traten geringe mononukleäre entzündliche Infiltrate in den Hirnhäuten auf. Das FSME-Virus-Antigen wurde immunhistochemisch in Neuronen nachgewiesen, hauptsächlich in den Purkinje-Zellen der Kleinhirnrinde und in geringerer Zahl in den pyramidalen Neuronen des Cortex. Obwohl das klassische Bild der weit verbreiteten multinodulären Läsionen nicht beobachtet wurde, war das Verteilungsmuster des viralen Antigens vergleichbar dem bei tödlich verlaufenden humanen Erkrankungen mit akutem oder perakutem klinischem Verlauf.
Vom Gehirn wurden zehn Proben zur Bestimmung des FSME-Virus-Antigens mittels PCR entnommen, die sowohl Groß- und Kleinhirn als auch Hirnstamm einschlossen. Sechs der zehn Proben waren positiv in der nRT-PCR, die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis ergab ein negatives Resultat. Die Sequenzierung dieser sechs PCR-Produkte zeigte eine vollständige Homologie mit dem FSME-Stamm Neudoerfl, dem Prototypen des Europäischen FSME-Virus-Subtyps, was impliziert, dass die Infektion vor Ort durch infizierte Zecken verursacht wurde. Das Serum wurde mittels ELISA getestet, wobei sich FSME-Antikörper nachweisen ließen.
Eine retrospektive Analyse anamnestischer Daten der betroffenen Affenhaltung zeigte, dass vermutlich auch in der Vergangenheit schon Affen sporadisch an FSME erkrankt waren.

Weitere Projekte

FSME-Inzidenz gegen Virus-Prävalenz und ansteigende Prävalenz von FSME-Virus bei am Menschen gesogenen Zecken in *Ixodes ricinus*
Süss, J., Klaus, C. und Diller, R.
(in Zusammenarbeit mit Schrader, C. [BfR, Berlin], Wohanka, N. und Kollegen [Labor Schubach, Passau] und Abel, U. [Universität Heidelberg])

3.9 BAKTERIELLE UND VIRALE MISCHINFEKTIONEN

Wechselwirkung zwischen bakteriellen und viralen Mischinfektionen der Regenbogenforelle
Kotterba, G. und Köllner, B.*
(in Zusammenarbeit mit Burr, S. [Institut für Veterinärbakteriologie, Universität Bern; Schweiz] und Rebl, A. [Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei, Dummerstorf])

Die Arbeiten zum Thema konzentrierten sich auf die Charakterisierung der Immunreaktionen von Forellen, die wesentlich für den Krankheitsverlauf und den Ausgang der experimentellen Infektion mit *Aeromonas salmonicida salmonicida (A.s.s.)* sind.
Mittels Analyse der Expression von CD-Molekülen auf mRNA-Ebene und durchflusszytometrischer Messung der Kinetik der Leukozytenpopulation im Blut und in den lymphatischen Organen wurde die Immunreaktion klinisch gesunder, moribunder und rekonvaleszenter Forellen nach experimenteller Monoinfektion mit einem *A.s.s.*-Wildtyp-Stamm und einer apathogenen *A.s.s.*-Mutante, JF 2747-ΔascV, verglichen.
Die Mutante unterscheidet sich gegenüber dem Wildtyp durch eine Deletion der inneren Membranverankerung des Typ-III-Sekretionsapparates, der, so funktionslos gemacht, das Studium der Immunreaktionen ohne Mortalitätsgeschehen vergleichend ermöglicht.
Mit dem *A.s.s*-Infektionsmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von MHC II und TLR mit der Schwere der Klinik korreliert. Die Analyse der Expression der CD-Moleküle TNFα, TLR, CD 56, NkeF (angeborenes Immunsystem) und CD4 und MHC II (erworbenes Immunsystem) zeigt, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems über den Ausgang der Infektion entscheidet. Anhand der ab dem 10. Tag nach Belastung mit der *A.s.s.*-Mutante in Milz, Kopfniere und Darm festgestellten deutlich erhöhten Expression von MHC II und CD 4 ist eine ausgeprägte humorale Immunantwort nachweisbar.
Die Untersuchungen wurden in gleicher Weise mit dem Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHSV) fortgesetzt. Die Versuchsdaten werden zur Zeit ausgewertet. Aus diesen Untersuchungen erhoffen wir uns Hinweise auf immunrelevante Faktoren, die nach bakterieller und viraler Infektion aktiviert werden, sowie eine Antwort auf die Frage, ob die frühe Aktivierbarkeit von angeborenen Immunfunktionen der Grund für eine erhöhte Resistenz gegen eine nachfolgende virale Infektion ist.

4. NEUE UND NEUARTIGE ZOONOSE-ERREGER

4.1 ÜBERTRAGBARE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN

BSE- und Scrapie-Erreger-Differenzierung und -Nachweis mittels konventioneller transgener Mausmodelle sowie alternativer Methoden
Buschmann, A.*, Gretzschel, A., Eiden, M. und Groschup, M.H.

Nachdem 2004 in Italien und Frankreich erstmals BSE-Fälle bei älteren Rindern beschrieben wurden, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften von den bisher bekannten klassischen BSE-Fällen unterschieden, wurde am INNT eine retrospektive Untersuchung der bis Ende 2005 in Deutschland diagnostizierten 389 BSE-Fälle durchgeführt, wobei besonderes Augenmerk auf die 27 Fälle gerichtet wurde, die bei Tieren auftraten, die älter als acht Jahre waren. Dabei wurde jeweils ein Fall detektiert, der dem H-Typ (H steht für höheres Molekulargewicht der unglykosylierten PrP-Fraktion) zugeordnet wurde, sowie ein Fall, der dem L-Typ (L steht für lower = niedrigeres Molekulargewicht der unglykosylierten PrP-Fraktion) entsprach. Beide Isolate wurden auf transgene Mäuse übertragen, die das bovine PrP überexprimieren, wobei die Inkubationszeit nach Applikation des L-Typ-Isolates im Vergleich zu klassischer BSE (185 anstelle von 230 Tagen) deutlich verkürzt war, während der H-Typ erst nach

durchschnittlich 322 Tagen zur Erkrankung führte. Inzwischen werden alle BSE-positiven Proben, die von über acht Jahre alten Tieren stammen, auf das Vorliegen von atypischer BSE untersucht. Es wurde jedoch bisher kein weiterer Fall detektiert.
Die auftretenden Scrapiefälle wurden auf das Vorliegen von klassischer bzw. atypischer Scrapie differenziert, wobei nur drei klassische Fälle und 22 atypische Scrapiefälle festgestellt wurden. Die klassischen Scrapiefälle wurden gemäß den Vorgaben der EU-Verordnung 999/2001 mit Hilfe des 2004/2005 am FLI etablierten und durch das EU-Referenzlabor zugelassenen FLI-Tests zur Stammdifferenzierung untersucht. Dabei ergab sich kein Hinweis auf eine BSE-Infektion.
Obwohl die Übertragbarkeit der atypischen Scrapiefälle auf ovine PrP transgene Mäuse inzwischen nachgewiesen wurde, besteht kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen den atypischen Scrapiefällen und den BSE-Infektionen bei großen und kleinen Wiederkäuern.
Entsprechend den Vorgaben der EU-Verordnung 999/2001 wurde bei allen deutschen TSE-Fällen bei Schafen der Prion-Genotyp bestimmt. Diese Arbeiten erfolgten unter maßgeblicher Beteiligung des Institutes für Tierzucht und Haustiergenetik an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Etablierung und Anwendung von transgenen Mausmodellen zur Aufklärung der Ätiologie und Pathogenese von TSE
Keller, M.*, Buschmann, A. und Groschup, M.H.

In den vergangenen Jahren wurden die transgenen Mausmodelle zur Analyse der Ätiologie und Pathogenese von Infektionskrankheiten, insbesondere von TSEs, am FLI weiter ausgebaut. Nach wie vor spielen Mäuse, die das bovine Prion-Protein überexprimieren (TgBov XV), hierbei eine entscheidende Rolle. Diese Tiere sind für BSE-Erreger 10.000mal anfälliger als herkömmliche Mauslinien. Für den Nachweis von Scrapie-Erregern dienen in den letzten Jahren generierte Mauslinien, die das ovine Prion-Protein überexprimieren. Durch die Verwendung von Transgenen, die zu Proteinen führen, die sich in für die Empfänglichkeit einer PrP^{Sc}-Infektion entscheidenden Aminosäuren unterscheiden (ARQ bzw. VRQ an den Positionen 136, 154 und 171 des ovinen Prion-Proteins), tragen diese Tiere zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Prion-Erkrankungen bei. Neben diesen und anderen transgenen Mauslinien, die speziesfremde Gensequenzen in sich tragen, führten weitere Ansätze zur Generierung von Mauslinien, bei denen die Glykosylierungsstellen an den Positionen 180 und 196 des murinen Prion-Proteins mittels PCR gestützter Mutagenese deletiert wurden. Diese Mausmodelle mit nicht- oder nur partiell glykosylierten Prion-Proteinen sollen dazu beitragen, die Rolle dieser posttranslationalen Modifikation für den Verlauf der Krankheit darzustellen.
Um die Gesundheit der Tiere zu erhalten und auszuschließen, dass exogene Krankheitserreger die Anfälligkeit der transgenen und konventionellen Mauslinien beeinflussen können, erfolgt die Zucht der Tiere inzwischen unter spezifisch Pathogen-freien Bedingungen. Um die Pathogenfreiheit dieses Bereiches aufrecht zu erhalten, werden entsprechende Schutzmaßnahmen durchgeführt. So werden alle Materialien, die in diesen Bereich eingebracht werden sollen, autoklaviert oder, wenn dies nicht möglich sein sollte, oberflächlich desinfiziert und durch eine Materialschleuse eingeschleust. Mauslinien, die in diesen Bereich neu eingebracht werden sollen, werden mittels Embryotransfer in isoliert gehaltene Muttertiere eingeschleust. Um den SPF-Status aufrecht zu erhalten, erfolgt eine vierteljährliche Überprüfung des Hygienestatus der Mäuse gemäß den Richtlinien der FELASA. Zu diesem Zweck wird aus jedem Tierraum eine der Gesamtpopulation angepasste Stichprobe an Tieren getötet und pathologisch, serologisch und mikrobiologisch untersucht. Ein Teil der Untersuchungen wird im FLI durchgeführt.

Untersuchung von natürlich exponierten oder experimentell infizierten ARR/ARR-Schafen auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} und/oder Scrapie-Infektiosität mit Hilfe biochemischer und transgener Methoden
Groschup, M.H.*, Hammerschmidt, B. und Buschmann, A.

Am FLI wurden 2006 Übertragungsversuche mit insgesamt 16 Proben aus dem Verdauungstrakt und dem lymphatischen System von britischen ARR/ARR-Schafen in Schaf-PrP-transgenen Mäusen initiiert. Schafe, die das ARR/ARR-Allel tragen, galten lange Zeit als absolut resistent gegenüber einer Infektion mit dem TSE-Erreger. Inzwischen ist allerdings bekannt, dass diese Tiere an atypischer Scrapie erkranken können und dass sie ebenfalls empfänglich für eine experimentelle BSE-Infektion sind. Allerdings konnte bisher PrP^{Sc} und Infektiosität nur im zentralen Nervensystem solcher Tiere nachgewiesen werden. Die in diesem Versuch eingesetzten Schafe wurden experimentell mit BSE infiziert und anhand dieser Maus-Bioassays soll überprüft werden, ob in den genannten Organen BSE-Infektiosität nachweisbar ist, obwohl

alle eingesetzten Proben im Western Blot ein negatives Ergebnis erbrachten. Diese Experimente werden vom britischen Landwirtschaftsministerium (Defra ARR) finanziert.

Nachweis der Übertragbarkeit von atypischen Fällen aus der Scrapie-Überwachung mittels konventioneller und transgener Mausbioassays

Gretzschel, A.*, Buschmann, A., Hammerschmidt, B. und Groschup, M.H.

Die gemäß der EU-Verordnung 999/2001 durchgeführten Übertragungsversuche zur Stammdifferenzierung der deutschen Scrapie-Isolate werden am FLI parallel in RIII-, C57Bl- und VM95-Mäusen (klassisches ‚strain-typing' nach etablierten Methoden) durchgeführt. Parallel dazu werden die Isolate auch in transgene Mäusen inokuliert, die das Prion-Protein ($PrP^{ARQ/ARQ}$) des Schafes überexprimieren (Tgshp-Mäuse). Aus Übertragungsstudien mit verschiedenen Scrapie- und BSE-Isolaten ging hervor, dass diese transgenen Mäuse für die Erreger hochempfänglich sind. Die herausragende Sensitivität der am FLI entwickelten transgenen Mäuse, die das bovine Prion-Protein überexprimieren (Tgbov XV), wurde in den vergangenen Jahren nachgewiesen. Auch die Inkubationszeiten nach Infektion mit Schaf-Scrapie-Isolaten (verschiedener PrP-Allele) waren in den bovinisierten transgenen Mäuse nur unwesentlich länger als die für die BSE-Isolate, jedoch deutlich kürzer als in konventionellen Mauslinien. Damit stellen diese Mäuse ebenfalls ein ideales Testsystem für den Nachweis geringer TSE-Erregermengen dar.
Eine Vielzahl deutscher und auch norwegischer Isolate atypischer Scrapie wurden zur Stammdifferenzierung in die genannten Linien der konventionellen und transgenen Mäuse inokuliert. Es zeigte sich dabei, dass keines der atypischen Isolate in konventionellen Mäusen eine klinische TSE-Erkrankung hervorrufen konnte. Diese Mäuse wurden nach Abschluss des Versuches auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} im Gehirn untersucht. Auch dies verlief in allen Fällen mit negativem Ergebnis. Auch die inokulierten Tgbov XV Mäuse blieben über mehr als 500 Tage klinisch unauffällig. Dagegen erkrankten die Schaf-PrP transgenen Mäuse nach Infektion mit atypischen Isolaten nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 250-350 Tagen, und bei etwa 70% der Mäuse konnten dann auch PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist dabei, dass das Western Blot-Profil aus dem Gehirn dieser Mäuse identisch war mit dem der Schafe, aus denen das Isolat gewonnen worden war. Das atypische Bandenmuster dieser Fälle blieb somit auch nach Passage in transgenen Mäusen erhalten. Analog zur Bestimmung der stammtypischen Läsionsprofile klassischer Scrapie-Stämme anhand der Vakuolisierungsgrade in definierten Hirnregionen wurden anschließend auch die Läsionsprofile der atypischen Isolate in Tgshp-Mäusen bestimmt. Diese wichen von allen bisher bekannten Profilen klassischer Scrapie-Isolate oder mauspassagierter Scrapie-Stämme ab, waren aber in guter Übereinstimmung mit dem Läsionsprofil, welches für französische atypische Scrapiefälle mit Hilfe transgener Mäuse entwickelt worden war, die das $PrP^{VRQ/VRQ}$-Allel des Schafes überexprimieren.

Untersuchungen zur Pathogenese der BSE-Infektion bei Schafen

Hoffmann, C.*, Hammerschmidt, B. und Groschup, M.H.

Mittels experimenteller BSE/Scrapie-Koinfektionen bei Schafen und Mäusen sollen im Rahmen eines von der EU geförderten Forschungsverbundes (*BSE in Sheep*) Fragen der Krankheitsentstehung und Erregerverbreitung geklärt werden. Von Interesse ist dabei, ob sich der BSE-Erreger in einer solchen Mischinfektion gegenüber Scrapie-Erregern durchsetzen kann. Hierzu wurden ovines PrP-überexprimierende transgene Mäuse mit BSE- und Scrapie-Erregern infiziert. Die unterschiedlichen Tiergruppen erhielten jeweils ein Gehirnhomogenat, das aus einem definierten Scrapie-Isolat und einem ovinen BSE-Isolat besteht. Die Koinfektion erfolgte dabei zunächst simultan. Zudem wurden in einem zweiten Versuchsansatz aufeinanderfolgende Inokulationen mit einem zeitlichen Abstand von vier Wochen durchgeführt. Zeitgleich werden entsprechende BSE/Scrapie-Koinfektionen bei Schafen am Institut National de la Recherche Agronomique in Tours, Frankreich durchgeführt. Bei diesen Tieren erfolgt eine regelmäßige Entnahme von Blut und Liquor cerebrospinalis, sowie von Biopsien der Tonsillen und der Nickhaut. Vor allem letztere bieten beim Schaf gute Möglichkeiten eines präklinischen PrP^{Sc}-Nachweises. Nach dem Auftreten klinischer Symptome werden die Schafe euthanasiert und seziert, wobei ebenfalls Proben des lymphatischen Gewebes und ausgewählte nervale Strukturen des Kopfes entnommen werden.
Anhand der im Mausbioassay gewonnenen und der von den französischen Kollegen zur Verfügung gestellten Proben soll der Nachweis und die BSE/Scrapie-Diskriminierung mit histopathologischen, immunhistologischen und biochemischen Methoden erfolgen. Die Tierversuche, und damit das Sammeln der Proben, werden voraussichtlich im Laufe des Jahres 2007 abgeschlossen sein.

Untersuchung zur BSE-Pathogenese bei Rindern
Hoffmann, C.*, Ziegler, U., Kupfer, L, Oelschlegel, A., Hammerschmidt, B., Kaatz, M., Keller, M., Buschmann, A. und Groschup, M.H.

Die Erregerausbreitung im Rind nach einer BSE-Infektion ist noch weitgehend ungeklärt. Am FLI wurden daher im Jahre 2003 56 Kälber oral mit je 100 g eines Mazerates aus BSE-positivem Rindergehirn infiziert. Weitere 18 Tiere dienen als nicht-infizierte Kontrollen. Nach einem definierten Sektionsplan werden seitdem alle vier Monate vier oder fünf Tiere euthanasiert und seziert, wobei über 1.400 Einzelproben aus mehr als 150 Organen und Geweben pro Tier entnommen und asserviert werden. Erste Ergebnisse aus immunhistologischen und biochemischen Untersuchungen an Proben, insbesondere aus dem zentralen und peripheren Nervensystem sowie aus dem lymphatischen System, zum Nachweis des pathologischen Prionproteins (PrP^{Sc}) liegen inzwischen vor. Dabei konnte bei mehreren Rindern PrP^{Sc} in den Peyerschen Platten des distalen Ileums nachgewiesen werden. Zwei klinisch unverdächtige Tiere wiesen zusätzlich eine geringgradige PrP^{Sc}-Ablagerung im Hirnstamm (Obex) auf. Die Zeiten bei diesen Rindern waren mit 24 und 28 Monaten post infectionem um acht bzw. vier Monate kürzer als bei vergleichbaren Studien aus Großbritannien. Die genaue Untersuchung dieser Tiere erlaubt es, die Erregerausbreitung während der Inkubationsperiode nachzuvollziehen: BSE Erreger steigen demnach ausgehend von den Peyerschen Platten des distalen Ileums über die Ganglien des vegetativen Nervensystems in die korrespondierenden Anteile des Rückenmarks und weiter zentripetal bis ins Gehirn auf. Zudem sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine simultane Ausbreitung entlang des Nervus Vagus. Für eine Beteiligung des lymphatischen Systems konnten hingegen keinerlei Hinweise gefunden werden. Die Ergebnisse klären nicht nur bisher unbekannte Aspekte der BSE-Pathogenese, sondern stellen auch eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer diagnostischer Strategien dar.

Definition des Spezifischen Risikomaterials bei BSE
Hoffmann, C.*, Hammerschmidt, B., Keller, M., Ziegler, U., Buschmann, A. und Groschup, M.H.

Der erste Fall boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) trat in Kanada im Mai 2003 auf. Ähnlich wie in der EU wurde in Kanada aufgrund dieses Falles die Entfernung des spezifizierten Risikomaterials als Verbraucherschutzmaßnahme ergriffen. Allerdings wird dort darunter bezüglich des Intestinums nur die Entfernung des distalen Ileums, nicht aber des gesamten Darmes verstanden. Das Ziel dieser von Health Canada (*Health Canada – SRM definition*) finanziell unterstützten und Ende 2006 begonnenen Studie ist daher, den BSE-Erregergehalt und die PrP^{Sc}-Konzentrationen im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe bei jungen Rindern zu bestimmen. Dazu wurden aus der deutschen BSE-Pathogenesestudie 16 oral mit BSE infizierte Rinder mit Inkubationszeiten von 12, 16, 20 und 24 Monaten ausgewählt. Zwei nicht infizierte Tiere mit entsprechenden Tötungszeitpunkten dienen als Negativkontrollen. Gefrorene und formalinfixierte Proben des Jejunums, des Ileums und des ileozaekalen Überganges mit nachweisbaren Peyerschen Platten sollen mittels BSE-Schnelltests (Bio-Rad TeSeE, IDEXX HerdChek) sowie mittels immunhistochemischer und PTA-Westernblotting-Methoden untersucht werden. Der Nachweis der Infektiosität soll im Maus-Bioassay mit bovines PrP^{C}-überexprimierenden transgenen Mäuse durchgeführt werden.

Studien zur Pathogenese bei Schafen nach alimentärer Infektion mit BSE- und Scrapie-Erregern
Hoffmann, C.*, Hammerschmidt, B. und Groschup, M.H.

In diesem von der EU geförderten Gemeinschaftsprojekt (*Sc-Gut*) wurden die initialen Vorgänge bei der Aufnahme von Scrapie-Erregern im Darm und im darmassoziierten Lymphgewebe untersucht. In einem ersten Versuchsansatz erfolgte in Schottland eine Infektion von Schafen mit dem Gehirnhomogenat von an Scrapie erkrankten Tieren, das *intra operationem* in isolierte ileale Darmabschnitte eingegeben wurde. Proben dieser Darmlokalisationen und der tributären Mesenteriallymphknoten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten *post operationem* (15 min, 2 h, 24 h, 3 d, 5 d, 10 d, und 30 d p.op.) entnommen. Der Nachweis des PrP im Darm sowie im darmassoziierten lymphatischen Gewebe erfolgte dabei mit Hilfe immunhistologischer Techniken. Da jedoch in der Immunhistologie eine Unterscheidung zwischen PrP^{Sc} und PrP^{C} nicht sicher möglich ist, wurde zusätzlich ein Maus-Bioassay initiiert. Zu diesem Zweck stehen am FLI entwickelte, ovines PrP^{C}-überexprimierende transgene Mäuse zur Verfügung, deren Empfänglichkeit für Scrapie nachgewiesen und deren PrP^{C}-Expression in nicht-neuronalen Geweben charakterisert ist.
In einer zweiten Studie soll die Akkumulation von PrP^{Sc} im peripheren lymphatischen Gewebe nach oraler Infektion untersucht werden. Hierzu wurden Wildtyp-Mäuse mit Scrapie-positivem Schaf-Gehirnhomoge-

nat oral infiziert. Ein Teil dieser Mäuse wurde zu einem definierten subklinischen Zeitpunkt, ein zweiter Teil nach dem Eintreten der klinischen Symptome getötet und neben dem Gehirn und der Milz auch die Peyerschen Platten des Jejunums und des Ileums sowie fünf verschiedene Lymphknoten entnommen. Mittels neu etablierter immunhistologischer Methoden sollen in weiterführenden Studien Veränderungen bei der Verteilung und der Morphologie der Leukozyten (T-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen) unter besonderer Berücksichtigung proliferativer und apoptotischer Vorgänge innerhalb der darmassoziierten und peripheren Körperlymphknoten untersucht werden. Der Versuchsaufbau entspricht im Detail dem eines vom norwegischen Kooperationspartner durchgeführten Experimentes am Schaf und ermöglicht somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse über Speziesgrenzen hinweg.

Untersuchung der molekularen Mechanismen bei der Vermehrung und Ausbreitung von Prion-Erregern in der Zellkultur und in zellfreien Systemen

Eiden, M.*, Kupfer, L., Proft, J., Franz, M. und Groschup, M.H.

Prion-Erkrankungen werden durch die Konformationsänderung (Konversion) eines zellulären körpereigenen Prionproteins (PrP^{C}) in eine pathologische Isoform (PrP^{Sc}) verursacht. Diese Isoform zeichnet sich im Gegensatz zu PrP^{C} durch einen erhöhten Anteil an Faltblattstrukturen aus. Die veränderten biochemischen Eigenschaften führen zu einer partiellen Resistenz gegenüber dem Abbau durch Proteinase K (PK) und der Fähigkeit, Aggregate und Fibrillen auszubilden. Um die molekularen Einflüsse während der Konversion zu untersuchen, wurde ein zellfreier Konversionsassay etabliert, der mit rekombinant hergestelltem Prionprotein arbeitet. Neu konvertiertes Prionprotein kann im Immunoblot mittels geeigneter Antikörper als neu gebildetes, PK-resistentes Fragment (PrP^{res}) detektiert werden. Mit Hilfe dieses Assays konnte gezeigt werden, dass verschiedene mauspassagierte TSE-Stämme (Me7, 22A, 87V, BSE/Bl6) ihre spezifische Konformation auch auf bakterielles Prionprotein übertragen. So besitzen die PrP^{res}-Fragmente, die mit PrP^{Sc} aus BSE-infizierten Mäusen generiert wurden, ein um 1 kDA niedrigeres Molekulargewicht verglichen mit Scrapie-inkubierten PrP^{res} Fragmenten. Ko-Inkubation von zwei verschiedenen Stämmen (Me7 und BSE/Bl6) führte zu synergistischen Effekten, d.h. zu einer signifikant erhöhten Konversionsrate. Durch die Einführung von Punktmutationen innerhalb des Prionproteins wurde ferner der maßgebliche Einfluss bereits einzelner Aminosäuren auf die Konversion gezeigt. Diese Effekte spielen bei den Übertragungsbarrieren zwischen verschiedenen Spezies sowie bei der allgemeinen Anfälligkeit eines Individuums für TSE-Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Die *In-vitro*-Ergebnisse zeigten eine hohe Übereinstimmung mit analogen Übertragungsversuchen auf transgene Mäuse.
Auch die spezifische Rolle des unstrukturierten N-terminus des Prionproteins wurde näher untersucht. Dazu wurden verschiedene N-terminale Deletionsmutanten (Δ91, Δ100, Δ113, Δ120, Δ124, Δ132) des Prionproteins rekombinant hergestellt und konvertiert. Erste Ergebnisse zeigen, dass hierbei die Konvertierbarkeit vom Umfang der Deletion abhängt und auch stammspezifische Effekte auftreten.

Studien zur Blockade von Prion-Infektionen in der Zellkultur und im Tiermodell

Eiden, M.*, Leidel, F. und Groschup, M.H.

Prion-Erkrankungen sind durch eine Änderung der Konformation des zellulären Prionproteins und der Akkumulation der pathogenen Form (PrP^{Sc})gekennzeichnet. Diese strukturellen Änderungen können *in vitro* in Zellkultur-Systemen unter weitgehend physiologischen Bedingungen analysiert werden. Für diese vom BMBF finanziell unterstützten Untersuchungen (*BMBF-Kausaltherapie*) wurden verschiedene Scrapie-infizierte Zelllinien verwendet: ScN_2A-Zellen (RML-infizierte Neuroblastom-[N_2A]-Zellen) und SMB-Zellen („Scrapie-Mouse-Brain“ mit 22F bzw. RML infiziert). Diese Zellen wurden für Massenuntersuchungen (Highthroughput Screening) adapiert und zur Suche von potentiellen Hemmstoffen der Prionprotein-Aggregation herangezogen. Für diese Untersuchungen wurde eine Substanzbibliothek (DIVERset 1) verwendet. Aus den insgesamt 10.000 Substanzen wurden 530 Inhibitoren identifiziert und die 16 wirksamsten Substanzen im Tierversuch getestet. Vor dem eigentlichen Therapieversuch wurde eine Toxizitätsstudie mit allen 16 Substanzen durchgeführt, ohne dass pathologisch-anatomisch und –histologisch Unverträglichkeiten festgestellt wurden. Für den sich anschließenden Therapieversuch wurden C57/Bl6-Mäuse verwendet, die mit dem Scrapiestamm RML infiziert wurden. Von den 16 Substanzen zeigten zwei Substanzen eine signifikante Verlängerung der Inkubationszeit. Weitere Untersuchungen hierzu folgen. Darüber hinaus wurde eine weitere Substanzbibliothek (Diverset 2, bisher >5040 Substanzen getestet) untersucht und eine Reihe weiterer im Hinblick auf Therapieansätze vielversprechender Substanzen gefunden.

Erweiterung der nationalen BSE-Probenbank und Serviceleistungen
Ziegler, U.* und Groschup, M.H.

Die nationale BSE-Probenbank gewährleistet als Teil der Nationalen TSE-Forschungsplattform („TSE-Forum"), dass von jedem deutschen BSE-Fall wie auch von den Tieren aus der BSE-Pathogenesestudie Probenmaterial gesammelt, fachgerecht gelagert und deutschen und europäischen Prion-Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt wird.
Die BSE-Gewebebank umfasst neben verschiedenen Gewebeproben aller in Deutschland bis dato 398 BSE-positiv getesteter Tiere (Stand 01.01.07) auch Proben von ca. 16.000 Kohortentieren zu ausgewählten Fällen. Des weiteren sind BSE-Standardhirnhomogenate sowie definierte Negativproben und BSE-differentialdiagnostisch relevante Proben vorrätig. In der Probenbank sind derzeit von zehn klinisch BSE-positiven Rindern aus dem Feld Körperflüssigkeiten (wie z.B. Vollblut, Plasma, Serum, Liquor und Harn) sowie tiefgefrorene bzw. formalinfixierte Gewebeproben vorhanden. Die Dokumentation der Probenbank erfolgt nach der GLP-Richtlinie. Im Rahmen der BSE-Pathogenesestudie wurden seit 2003 mehr als 185.500 Einzelproben (Stand: 31.12.2006) von den infizierten Rindern und zugehörigen Kontrolltieren asserviert. Das Probenspektrum umfasst neben Körperflüssigkeiten (Blut, Serum, Plasma, Liquor, Speichel, Harn) auch Gewebeproben (ca. 150 verschiedene Gewebearten je seziertem Rind) aus den regelmäßigen Sektionen. Alle diese Materialien wurden in einer computergestützten Datenbank unter Verwendung eines Etiketten-Barcodesystems registriert. Im Jahre 2006 wurden aus der Probenbank insgesamt 1.500 Einzelproben an 18 verschiedene TSE-Arbeitsgruppen versandt.

Nachweis und Bestimmung der Überlebensfähigkeit von BSE-Erregern in Nahrungsmitteln und in der Umwelt
Groschup, M.H.*, Buschmann, A. und Hammerschmidt, B.

Die Frage eines möglichen mikrobiellen Abbaus von BSE-Erregern in Nahrungsmitteln und im Gastrointestinaltrakt von Rindern wird in Zusammenarbeit mit der Ludwig-Maximilians-Universität München, der TU München und der Bundesanstalt für Fleischforschung (BAFF) bearbeitet. Finanzielle Unterstützung erhalten diese Arbeiten durch das Land Bayern (*Forprion*). In einer ersten Testreihe wurden über 700 verschiedene Bakterienstämme und/oder deren Kulturüberstände auf proteolytische Aktivität für das pathologische Prionprotein (PrP^{Sc}) getestet. Als Readout-Verfahren dienten ein Sandwich-ELISA sowie der Immunoblot. In einem zweiten Untersuchungsansatz wurde Scrapie-PrP^{Sc} unter anaeroben Bedingungen in Pansensaft gemischt und mittels dieser Verfahren sowie eines Hamster-Bioassays auf Inaktivierung getestet. Die nun vorliegenden Ergebnisse belegen, dass es zwar durch mikrobielle Proteolyse zu einem Abbau des PrP^{Sc} unter die immunochemische Nachweisgrenze kommt, dass allerdings trotzdem erhebliche Erregermengen erhalten bleiben.

Vermehrung und Titration von Scrapie-Erregern aus Mäusen und Hamstern zur Prozessvalidierung der Produktschritte bei der Aufarbeitung und Reinigung von therapeutischen Proteinen aus humanem Plasma
Groschup, M.H.* und Buschmann, A.

Das Vorkommen von vCJD-Fällen im Vereinigten Königreich und in Frankreich bei Empfängern von Produkten, die aus dem Blut präklinisch vCJD-infizierter Spender hergestellt waren, hat zu Diskussionen hinsichtlich der Sicherheit von Bluttransfusionen geführt. Daher wurden in Zusammenarbeit mit einem industriellen Partner Untersuchungen zu den Abreicherungskinetiken für Scrapie-Prionen im Rahmen der Herstellung von therapeutischen Proteinen aus humanem Plasma durchgeführt. Hierzu wurden mit Maus- oder Hamster-Scrapie-Erregern versetzte Ausgangsproben verwendet und die Zwischen- und Endprodukte auf Erregerfreiheit bzw. auf den jeweils verbleibenden Erregergehalt getestet. Die Erregerkonzentrationen wurden mittels Immunoassays und mittels hochempfindlicher Hamster-Bioassays ermittelt. Erste Ergebnisse deuten bei den verwendeten Aufreinigungsverfahren auf eine deutliche Abreicherung der Scrapie-Prionen in den relevanten Fraktionen hin.

Europäisches Exzellenz-Netzwerk (NoE) *Neuroprion*: Verhinderung, Kontrolle und Management der Prion-Erkrankungen
Groschup, M.H.* und Mitarbeiter

Seit September 2003 existiert das von der EU geförderte Exzellenznetzwerk *Neuroprion*, ein Konsortium aus 52 führenden europäischen Forschungsinstitutionen. Die primären Ziele von *Neuroprion* sind die Strukturierung und Integration der wichtigsten Prion-Forschergruppen, um die Fragmentierung der Forschung zu beenden. So wurde ein gemeinsames Arbeitsprogramm eingeführt, welches sich auf die folgenden Forschungspfeiler stützt: Prävention (Dekontamination, Diagnose, Unterscheidung von Erregerstämmen), Behandlung (Entwicklung neuer Medikamente, Definition neuer therapeutischer Ziele), Kontrolle (epidemiologische Überwachung bei Mensch und Tier, menschliche und tierische Gewebebanken) und Risiko (Risikofaktoren, ihre Bewertung und das zugehörige Risikomanagement).

Der Effekt einer Depletion von Leukozyten auf die Übertragung von BSE durch Transfusion von ovinen Blutbestandteilen
Groschup, M.H.* und Mitarbeiter

Die BSE-Infektion von Schafen wird als experimentelles Modell für die vCJD-Übertragung durch Bluttransfusionen genutzt. BSE-Infektionen verlaufen bei Schafen, ähnlich wie beim Menschen, auch über den Blutweg aus dem Darm in das ZNS. Im Rahmen dieses Projektes wird das Vorhandensein von BSE-Erregern in einzelnen Blutfraktionen infizierter Schafe untersucht. Hierzu werden Schafe experimentell mit BSE infiziert (unter Federführung des Institute for Animal Health, Compton, Vereinigtes Königreich) und anschließend Gesamtblut und Blutfraktionen (Plasma, Blutplättchen, Erythrozythen u.a.) zu verschiedenen Zeitpunkten in der Inkubationszeit gesammelt. Die so gewonnenen Proben werden anschließend in Maus-Bioassays auf BSE-Infektiosität untersucht. Hierzu werden die Schaf-PrP^{C}-überexprimierenden transgenen Mäuse verwendet. Ein Teil der Versuche wird in enger Kooperation mit der Greifswalder Biotechnikfirma Mikromun GmbH durchgeführt.

Herstellung prionfreier tierischer Produkte durch enzymatischen Abbau
Groschup, M.H.*, Hammerschmidt, B. und Buschmann, A.

Im Rahmen dieses in Kooperation mit dem Central Institute for Animal Disease Control (CIDC-LELYSTAD) durchgeführten Projektes wurde die Fähigkeit von Keratinase, einem der stärksten proteolytisch wirksamen Enzyme, zur Zerstörung von BSE-Prion-PrP^{Sc} und BSE-Infektiosität getestet. Keratinase hatte bereits in Vorversuchen eine gewisse dekontaminierende Aktivität gezeigt (Langeveld et al. 2003). Hierbei wurde BSE-Gewebe-Homogenat zunächst auf 115°C erhitzt und anschließend mit Keratinase behandelt. Zur Messung der Anfangsinfektiosität und der nach der Behandlung verbliebenen Restinfektiosität wurden die Proben in Rinder-PrP^{C}-überexprimierende transgene Mäuse inokuliert. Ein Teil dieser Versuche wurde in Kooperation mit der Greifswalder Biotechnikfirma Mikromun GmbH durchgeführt. Die bisher vorliegenden Ergebnisse sprechen eher gegen eine hinreichende BSE-Erreger-inaktivierende Wirksamkeit von Keratinase.

Gewinnung von biologischen Ressourcen zur Identifizierung von BSE Surrogat-Markern im Blut – Transkriptom-Untersuchungen zur Rolle des Immunsystems bei der BSE-Pathogenesestudie in Rindern
Brenn, A.* und Groschup, M.H.

Dieses vom britischen Verbraucherschutzministerium (*DEFRA*) finanziell unterstützte Projekt ist eine Zusammenarbeit zwischen dem Roslin Institute und dem FLI, wobei am FLI Blutproben im Rahmen der deutschen BSE-Pathogenesestudie entsprechend den wissenschaftlichen Anforderungen gesammelt werden. Im Berichtszeitraum wurde die fortlaufende zweimonatige Sammlung von Blutproben aus einer kleinen Gruppe von Rindern fortgesetzt, die Bestandteil der deutschen BSE-Pathogenesestudie sind (vier Tiere aus der BSE-Infektionsgruppe und drei aus der uninfizierten Kontrollgruppe). Somit kann ein verlässlicher Zeitverlauf von Veränderungen im Genexpressionsmuster während des Infektionsverlaufes ermittelt werden. Die peripheren weißen Blutzellen (PWBCs) wurden aus den Blutproben isoliert und durch auf Antikörpern basierende Zellsortierung (MACS) in neutrophile Zellen/Granulozyten und Monozyten, T- und B-Zellen fraktioniert. Jede Subpopulation wurde in RNA*later*-Lösung gelagert, die zelluläre RNA stabilisiert und eine Langzeitlagerung ohne einen Verlust von RNA-Qualität und -Quantität

erlaubt. Nach der RNA-Extraktion und dem Versand an das Roslin-Institute erfolgte eine RNA-Qualitätskontrolle, reverse Transkription in fluoreszenzmarkierte cDNA und Hybridisierung auf einem Affimetrix GeneChip® Bovine Genome Array mit 23.000 Genen. Gene mit BSE-korrelierten Genexpressionsveränderungen wurden durch quantitative RT-PCR (qRT-PCR) verifiziert.

Charakterisierung und therapeutischer Einsatz von Prion-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Petsch, B., Nebrich, S., Pfaff, E., Planz, O., Rziha, H.-J. und Stitz, L.*
(in Zusammenarbeit mit C. Korth [Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf]

Für dieses Projekt wurden Prion knock-out Mäuse ($PrP^{0/0}$), die im Gegensatz zu Wildtypmäusen immunologisch nicht tolerant gegen das Prionprotein sind, mit Phosphor-Wolframsäure (NaPTA)-gefälltem, pathologischem, murinem Prionprotein immunisiert. Aus erfolgreichen Fusionen wurden zunächst acht monoklonale Antikörper identifiziert, die das Prionprotein erkennen. Diese Antikörper wurden auf ihre Verwendung in den gängigen immunologischen und biochemischen Methoden getestet. Hierbei zeigte sich, dass einer der Antikörper in allen untersuchten Methoden einsetzbar ist. Diese umfassen Westernblot, ELISA, Zellblot, FACS und immunhistologische Untersuchungen an Paraffinschnitten sowie Reaktivität mit den auf Nitrozellulose übertragenen Kryoschnitten (Histoblot). Die Bindungskonstante dieses Antikörpers an rekombinantes zelluläres PrP wurde bestimmt und zeigte eine außergewöhnlich hohe Bindungsfähigkeit im BIACORE-System. Vergleichende Untersuchungen im Westernblot zeigten, dass dieser Antikörper das pathologische PrP^{sc} mindestens achtmal besser bindet als der kommerziell erhältliche Antikörper 6H4. In Zellkulturversuchen konnte weiterhin gezeigt werden, dass dieser Antikörper die Menge an PrP^{sc} in persistent infizierten ScN2a–Zellen drastisch reduzieren kann. Während einer Kultivierung in Anwesenheit des Antikörpers ist PrP^{sc} nicht mehr oder nur noch geringgradig nachzuweisen, nimmt jedoch nach Beendigung der Antikörperzugabe wieder zu. Auf diesen Ergebnissen basierend werden erste therapeutische Anwendungen des Antikörpers durchgeführt. Hierzu wurden *In-vivo*-Versuche begonnen, bei denen Mäuse dauerhaft mit Antikörper behandelt werden. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf den Einsatz eines generierten „single-chain"-Fusionsantikörpers gelegt. Dieser zeigt ebenfalls die oben genannte Reduktion des PrP^{sc} *in vitro*. Auf Grund seiner deutlich geringeren Größe von ~ 30 kDa gegenüber den 180 kDa des vollständigen IgG-Moleküls erhoffen wir uns eine bessere Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirnschranke durch diesen Antikörper.

Untersuchungen zur Resistenz und Empfänglichkeit von Schafen gegenüber dem Scrapieerreger

Petsch, B., Nebrich, S., Voigt, H., Rziha, H.-J., Pfaff, E. und Stitz, L.*
(in Zusammenarbeit mit H. Geldermann und S. Preuss [Universität Stuttgart-Hohenheim])

Bei diesem im Jahre 2003 begonnenen Projekt wurden 120 Schafe, die sich hinsichtlich ihrer PrP-Genotypen maximal unterscheiden, oral mit Gehirnmaterial an Scrapie erkrankter Schafe inokuliert. In diesem gemeinschaftlichen Projekt werden mehrere neue DNA-Positionen im und flankierend zum PrP-Gen einbezogen, die einfach darstellbar und hochpolymorph sind. Diese DNA-Marker sollen darauf überprüft werden, wie sie im Vergleich zu den bislang bekannten Markern mit Disposition oder Resistenz nach Infektion mit PrP^{Sc} assoziiert sind. Da viele DNA-Positionen (Fragmentlängenanalyse von Mikrosatellitenpositionen, SNP-Darstellung mit der *real-time* PCR sowie vergleichende DNA-Sequenzierung) berücksichtigt werden und diese sehr polymorph sind, lassen sie sich effizient für eine Feinkartierung von Geneffekten auf die Scrapie-Resistenz verwenden. Mit den neuen DNA-Markern können resistente Zuchttiere besser als bisher identifiziert und bevorzugt zur Nachkommenproduktion verwendet werden, um auf diesem Wege eine züchterische Selektion von resistenten Tieren zu erreichen. Die inokulierten Tiere werden regelmäßig auf das Auftreten klinischer Symptomatik überwacht, in dreimonatigen Abständen wird Serum entnommen und das Körpergewicht bestimmt. Nach 23-monatiger Inkubationszeit erkrankten erste Schafe mit klinischen Symptomen, die kaum mit den in der Literatur beschriebenen übereinstimmen. Die betroffenen Tiere zeigten im Wesentlichen nur eine Kachexie und wurden aus Tierschutzgründen getötet. In einigen Fällen konnten leichte bis mittelgradige zentralnervöse Symptome festgestellt werden. Bei der Sektion wurden diverse Gewebe asserviert. In elf von vierzehn bisher untersuchten Tieren wurde das pathologische Prionprotein in verschiedenen definierten Regionen des Gehirns mittels Western blot nachgewiesen.

Thermische Inaktivierung der Infektiosität des pathologischen Prionproteins in Gegenwart von Fett oder Glycerol

Gagulić, E. und Stitz, L.*
(in Zusammenarbeit mit Müller, H. und Riesner, D. [Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf])

In diesem gemeinsamen Projekt wurde zunächst bestätigt, dass die hydrolytische Fettspaltung das Risiko einer TSE-Kontamination durch Rindertalg enthaltende Produkte für die menschliche Ernährung effektiv auf ein Minimum reduziert. Weiterhin wurde die Inaktivierung der Infektiosität und die Degradation des Prionproteins in Anwesenheit oder Abwesenheit von Fett, Fettsäuren oder Glycerol untersucht. Unter allen gewählten Bedingungen wurde eine deutlich effizientere Reduktion der Infektivität gefunden. Die Degradation des Prionproteins war hingegen weniger effektiv. In Anwesenheit von Fett, Fettsäuren oder Glycerol war das pathologische Prionprotein eher gegen eine hitzeinduzierte Degradation geschützt. Im Gegensatz dazu steigerte die Anwesenheit von Fett die Effizienz der Inaktivierung der Infektivität des pathologischen Prionproteins durch Hitze. Die erwähnten Untersuchungen zur Infektivität wurden in Bioassays in Hamstern durchgeführt.

Übertragung des Scrapie-Erregers auf aerogener Route

Stitz, L.*, Klevenz, B., Gagulić, E., Planz, O. und Pfaff, E.
(in Zusammenarbeit mit Heikenwälder, M., Mertz, K., Aguzzi, A. [Universitätsspital Zürich])

Prionen als Ursache der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien können in ihre Wirte über eine Vielzahl von extrazerebralen Infektionswegen eindringen, einschließlich parenteraler Injektion, Skarafikation der Haut und orale Verabreichung. Als effizientester Weg der Prionenübertragung wird die intrazerebrale Inokulation angesehen. Im Gegensatz zu den bekannten natürlichen und experimentellen Übertragungswegen wurde bisher eine Übertragung über die aerogene Route nicht untersucht, weshalb wir diese Möglichkeit experimentell überprüft haben. Wir konnten zeigen, dass Wildtyp und PrP-überexprimierende transgene Mäuse nach einer Exposition gegenüber aerosolisierten Gehirnhomogenaten von terminal erkrankten Mäusen Symptome der Scrapieerkrankung entwickelten. Um weitere unterstützende Hinweise auf eine Übertragung über die aerogene Route zu erhalten, wurden Mäuse außerdem direkt intratracheal inokuliert, was ebenfalls zu typischer klinischer Symptomatik führte. Die Gehirne aller erkrankten Tiere enthielten Proteinase K-resistentes pathologisches Prionprotein und verursachten wiederum Scrapie nach intrazerebraler Inokulation in Indikatormäuse. Nach einer Exposition gegenüber niedrig dosierten Aerosolen wurde zwar keine klinische Erkrankung festgestellt, die Tiere wiesen jedoch wiederum pathologisches Prionprotein im Gehirn auf, was für einen subklinischen oder präklinischen Verlauf von Scrapie spricht. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Inhalation von prionhaltigen Aerosolen einen erstaunlich effizienten Übertragungsweg darstellt.

PrP^{Sc} induzierte Änderungen zellulärer Genexpression

Nebrich, S., Gagulić, E., Petsch, B., Stitz, L. und Rziha, H.-J.*

Schwerpunkt des letzten Jahres waren vergleichende Untersuchungen zum Zusammenhang der klinischen Erkrankung mit spongiformer Veränderung, Astrogliose und Akkumulierung von pathologischem PrP^{Sc} im Gehirn verschiedener Mausstämme. Die Wildtypstämme CD-1 und C57/Bl6 sowie der transgene, PrP^{C} überexprimierende Mausstamm tga20 wurden mit PrP^{SC} (RML) intracranial (ic), intraperitoneal (ip) oder oral infiziert. Zu fünf verschiedenen Zeiten nach der Inokulation wurden jeweils vier Tiere getötet (präklinisches Stadium, beginnende und terminale Erkrankung) und deren Gehirne histologisch sowie immunhistochemisch auf Astrogliose und PrP^{SC}-Ablagerungen untersucht. Weiterhin wurde in den gleichen Gehirnen mittels semi-quantitativer RT-PCR die Stärke der GFAP-Expression (Astrozyten-Aktivierung) und mittels Western blot-Analysen die Menge des Proteinase K-resistenten PrP^{SC} bestimmt. Alle Analysen bestätigten, dass i.c. oder i.p. inokulierte Wildtyp-Mäuse schon im präklinischen Stadium deutliche spongiforme Veränderungen und Astrozytose im Gehirn aufweisen, was mit dem Vorliegen Proteinase K-resistenten PrP^{SC} einhergeht. Dagegen fand sich im Gehirn der tga20 Mäuse nach i.c. oder i.p. Inokulation erst im terminalen Krankheitsstadium Vakuolisierung, Astrogliose und PrP^{SC}, allerdings auch dann in deutlich geringerem Ausmaß verglichen zu den beiden Wildtyp-Mausstämmen.
Die orale Inokulation führte bei allen drei Mausstämmen zu einem zeitlich uneinheitlichen Krankheitsverlauf der einzelnen Tiere. Bemerkenswert war, dass in allen Gruppen mehrere Tiere selbst 500 Tage nach der Inokulation weder krank wurden noch im Gehirn degenerative Veränderungen oder PrP^{Sc} aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tiere des transgenen Mausstammes tga20 sich hinsichtlich neurodegenerativer Veränderungen und Neurotoxizität des PrP^{Sc} deutlich von denen der beiden Wildtyp-Mausstämme CD-1 und C57/Bl6 unterscheiden. Inwieweit die ca. 10fache erhöhte Expression des zellulären Prionproteins für die eindeutig verminderte Neurotoxizität bei der tga20 Maus, trotz beschleunigter Erkrankung, eine Rolle spielt, bleibt spekulativ. Interessanterweise zeigen diese Tiere verglichen zum Wildtyp-Mausstamm auch deutlich geringere und im Cerebrum mehr auf den Hypothalamus beschränkte PrP^{Sc}-Ablagerungen.

Europäisches Netzwerk der Surveillance und Bekämpfung von TSE in kleinen Wiederkäuern
Kramer, M.*

Dieses von der Europäischen Union geförderte Verbundprojekt unter dem Akronym SRTSENETWORK hat sich zur Aufgabe gestellt, ein langfristiges und nachhaltiges Netzwerk hinsichtlich der Erlangung und Verbreitung von Kenntnissen insbesondere auf den Gebieten der Epidemiologie, Pathologie und Diagnostik von TSE bei kleinen Wiederkäuern (SR-TSE) aufzubauen. Dabei besteht das Netzwerk sowohl in formellen Treffen und Zusammenarbeiten der beteiligten Institutionen als auch in der Entwicklung von nachhaltigen Instrumenten des Informationsaustauschs auch über die Zeitdauer des Projektes hinaus. Mit Hilfe des Projektes soll das verfügbare Wissen über die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien bei kleinen Wiederkäuern auf folgenden Gebieten zusammengetragen und verarbeitet werden:
Epidemiologische Surveillance, Übertragung und Unterhaltung der Infektion, Pathogenese und Entwicklung diagnostischer Tests, Integration von Risikoanalysen in die Bekämpfungs- und Überwachungsaktivitäten, Entwicklung von Bekämpfungsmethoden und Einbeziehung fortgeschrittener epidemiologischer Methoden (z.B. Modellierung und Risikobewertungen).

Etablierung reportergenmarkierter infektiöser Prionproteine
Voigt, H., Baumgartner, A. und Pfaff, E.*
Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) können sowohl oral als auch durch intraperitoneale oder intrazerebrale Infektion übertragen werden. Das Verständnis der Übertragungswege und der Infektionsausbreitung im Tier stellt dabei ein zentrales Problem der TSE-Forschung dar. Ziel des vorliegenden Projektes war daher die Konstruktion verschiedener Prion-EGFP-Fusionskonstrukte bzw. Prion-Luziferase-Fusionskonstrukte sowie die Expression und anschließende Konversion zu markierten Prion-EGFP-Fusionsproteinen und Prion-Luziferase-Fusionsproteinen.
Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene Prion-EGFP-Fusionskonstrukte und Prion-Luziferase-Fusionskonstrukte hergestellt (230e+, 32e+, 93e+).
Mit Hilfe dieser Konstrukte wurden rekombinante Baculoviren hergestellt, mit denen die Expression der rekombinanten Prion-EGFP-Fusionsproteine nach Infektion in SF9-Zellen nachgewiesen werden konnte. Die entstandenen Fusionsproteine wurden entweder nativ oder denaturierend aufgereinigt, wobei der am c-Terminus der Fusionsproteine vorhandene His-Tag verwendet wird. Diese Fusionsproteine werden in verschiedenen *In-vitro*-Konversionsexperimenten weiter analysiert.

Hochdruckbehandlung als mildes Verfahren zur Inaktivierung von TSE-Erregern
Voigt, H. und Pfaff, E.*
(in Zusammenarbeit mit Heindl, P., Butz, P. und Tauscher, B. [Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe])

Die „protein only"-Theorie postuliert, dass es sich bei den Erregern der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) um fehlgefaltete zelluläre Proteine, die Prionen, handelt. Das pathogene Prion-Protein (PrP^{Sc}, Sc = Scrapie) besitzt dabei eine andere räumliche Anordnung als das zelluläre Protein (PrP^{C}, C = cellular), das in vielen Zellen, besonders auch in den Nervenzellen von Säugetieren und Menschen, vorkommt. Eine TSE-Erkrankung tritt auf, wenn PrP^{C} zu PrP^{Sc} umfaltet, dies führt zu einer Akkumulation von PrP^{Sc}-Aggregaten im Zentralen Nervensystem. Die hohe Stabilität gegenüber Erhitzung und mikrobiellem Abbau des pathogenen Prionproteins stellt ein großes Problem für dessen Inaktivierung dar. Geeignete Inaktivierungsmethoden, wie z.B. Autoklavieren bei 133 °C für 20 min, Behandlung mit konzentrierter Natronlauge oder starken Oxidationsmitteln sind aggressiv und führen zu einem starken Verlust an Qualität und Textur des zu behandelnden Materials. Ein milderes Verfahren zur Reduktion der Infektiosität und Stabilität von Prionen stellt dagegen eine Hochdruckbehandlung dar. Die Hochdrucksterilisation ist im Vergleich zur Hitzebehandlung ein mildes Verfahren, das in der Lebensmittelindustrie zunehmend an Bedeutung gewinnt, da Geschmack-, Farb- und Nährstoffe weitaus

weniger in Mitleidenschaft gezogen werden als bei der konventionellen Hitzesterilisation. Im Rahmen dieses Projektes wird untersucht, inwieweit die Hochdrucktechnologie zur Inaktivierung von infektiösem TSE-Material angewandt werden kann. Es galt dabei herauszufinden, ob Druck in der Lage ist, die Struktur der infektiösen Prionproteine derart zu beeinflussen, dass es zum Verlust ihrer Infektiosität kommt. Dazu wurde infektiöses Gehirnmaterial von Scrapie-infizierten Hamstern mit einem Druck von 8 kbar bei 20 bis 80 °C unterschiedlich lange behandelt. Anschließend wurde untersucht, welche Auswirkungen diese Behandlung auf die charakteristischen Eigenschaften der Prionen haben. Der Effekt auf die Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau (Proteinase K-Resistenz) wurde immunologisch mittels Western blot-Analyse untersucht, während die Wirkung auf die Infektiosität anhand von Tierversuchen ermittelt wurde.
Bereits bei einer Hochdruckbehandlung bei 20 °C ist eine Intensitätsabnahme der Proteinbande nach Proteinase K-Verdau (PK+) zu beobachten. Deutliche Effekte sind jedoch erst bei höheren Temperaturen von 60 bis 80 °C zu beobachten. In diesen Fällen reicht eine 30minütige Druckeinwirkung aus, um die Konzentration der resistenten Prionen unter die Nachweisgrenze zu senken. Mittels mehrerer aufeinanderfolgender kurzer Druckimpulse konnte die Druckhaltezeit weiter gesenkt werden.
Die Infektiositätsversuche mit Hamstern zeigten eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Druckinaktivierung infektiöser Proben. Die hiermit erhaltenen Inaktivierungsraten von 4 bis 7 log ID_{50}-Einheiten/g sind vergleichbar und z. T. sogar besser als die der empfohlenen Dekontaminierungsmethoden, wie z.B. Dampfsterilisation bei 134°C für 60 min (6,7 log ID_{50}-Reduktion) oder die Behandlung mit 1 M Natronlauge für 60 min (5,5 log ID_{50}-Reduktion). Die hier angewandten Temperaturen liegen mit 60-80 °C deutlich unterhalb der Sterilisationsbedingungen und sind daher weitaus materialschonender.
Da das Verhalten eines Proteins unter Druck durch dessen Konformation bestimmt wird, konnten zusätzlich neue Kenntnisse über die komplexe Faltung der infektiösen Prionproteine gewonnen werden. Die Hochdruckbehandlung infektiöser Hamster-Prionproteine konnte Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität verschieden aufgearbeiteter Prionproteine aufzeigen. Je nach Umgebungsbedingungen (pH-Bedingung, Salzkonzentration) und Aufarbeitung (Homogenisierung, Isolierung) zeigte sich das infektiöse Prionprotein unterschiedlich druckstabil. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das infektiöse Prionprotein in unterschiedlich stabilen Konformationen vorliegen kann, die verschieden resistent gegenüber einer Inaktivierung sind.

Weitere Projekte

Verbesserung der diskriminatorischen Diagnostik der TSE-Infektionen bei Ziegen und Abschätzung zum Vorkommen von BSE-Prion-Erregern in Ziegenmilch und –fleisch
Hoffmann, C., Ziegler, U., Eiden, M., Hammerschmidt, B., Buschmann, A. und Groschup, M.H.

4.2 NAGETIER-ÜBERTRAGBARE ZOONOSE-ERREGER

Ulrich, R.G.*, Schmidt, J., Mertens, M., Hoffmann, B., Starick, E., Groschup, M.H. und Buschmann, A.

Nagetiere stellen ein bedeutendes Reservoir für unterschiedliche Zoonoseerreger (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) dar. Um Untersuchungen zur Populationsentwicklung bei Nagetieren und der Verbreitung und genetischen Veränderung von Hantaviren und anderen Nagetier-assoziierten Zoonoseerregern sowie den Konsequenzen für die Infektionsgefährdung der Bevölkerung zu kombinieren, wurde zusammen mit über 20 Kooperationspartnern (vorwiegend aus Deutschland) ein Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“ etabliert.
Die Pilotstudie zum langfristigen Monitoring von Nagetieren, Nagetier-übertragbaren Pathogenen und deren potentiellen Veränderungen im Land Brandenburg wurde fortgesetzt. Diese seit dem Jahr 2001 laufende Longitudinalstudie zur Verbreitung und Häufigkeit von Hantavirus-Infektionen zeigte an drei von zehn Fangorten ein stabiles Vorkommen von Tulavirus (TULV)-infizierten Nagetier-Reservoiren. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass das TULV in Brandenburg nicht nur in der Feldmaus (*Microtus aravlis*), sondern auch in der Erdmaus (*M. agrestis*) vorkommt. Weiterführende Untersuchungen sollen jetzt die Evolution der Assoziation des TULV mit den beiden Reservoirwirten genauer charakterisieren. Inzwischen wurden die Untersuchungen auf weitere Bundesländer ausgeweitet. Dafür stehen Nagetier-Proben aus Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Bayern und Baden-Württemberg zur Verfügung.

Im Rahmen des Netzwerkes haben wir die Untersuchungen zur Charakterisierung der Puumalavirus (PUUV)-Stämme in den Hantavirus-Ausbruchsgebieten Niederbayern, Köln und Osnabrück fortgesetzt. Umfangreiche molekularbiologische Untersuchungen bestätigten das Vorkommen von drei unterschiedlichen PUUV-Stämmen in den genannten Regionen.
Inzwischen wurden auch Untersuchungen zum möglichen Vorkommen von anderen Pathogenen in Nagetieren begonnen. Serologische und molekularbiologische Untersuchungen von ca. 50 Kleinsäuger-proben von Fangorten auf Rügen (Nähe Wittower Fähre und Schaprode) und von ca. 90 Ratten aus Thailand lieferten bisher keine Hinweise auf Infektionen mit dem H5N1-Influenzavirus. Molekular-biologische Untersuchungen zum Vorkommen von Herpesviren in wildlebenden Nagetieren aus Deutschland und Thailand zeigten eine Vielfalt von verschiedenen, bisher unbekannten beta- und gamma-Herpesviren. Inzwischen wurden weitere Kooperationen etabliert, um die Nagetiermaterialien für Untersuchungen zur Prävalenz weiterer Nagetier-übertragbarer Pathogene in Deutschland zu nutzen.

5 PARASITEN

5.1 ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Die zur Familie der *Taeniidae* gehörende Gattung Echinococcus enthält mehrere Arten sehr kleiner, wenige Millimeter langer Bandwürmer, die im Dünndarm von Fleischfressern (Hund, Fuchs, Marderhund, Katze) parasitieren. In Deutschland kommen *Echinococcus multilocularis* („kleiner Fuchsbandwurm") und *Echinococcus granulosus* vor. Neuerdings werden die früher als Stämme von *E. granulosus* angesehenen Taxa, welche das Pferd beziehungsweise das Rind als Zwischenwirt nutzen, als eigenständige Arten (*E. equi* bzw. *E. ortleppi*) bezeichnet. Während Echinokokken beim Endwirt (Fleischfresser) keine oder nur geringfügige pathologische Veränderungen hervorrufen, kann die Ansiedlung ihrer Larvalstadien im Menschen und in den Zwischenwirten zu schwerwiegenden oder sogar tödlichen Erkrankungen führen. Wegen der hohen Pathogenität der Larvalstadien der Echinokokken-Arten gehören die zystische Echinokokkose (verursacht durch *E. granulosus*) und die alveoläre Echinokokkose (verursacht durch *E. multilocularis*) zu den wichtigsten durch Helminthen verursachten Zoonosen.

Räumlich-zeitliche Analysen zur Epidemiologie des Kleinen Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*

Conraths, F.J.*, Staubach, C. und Tackmann, K.

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 kleine Bandwürmer im Dünndarm und scheiden diese auch für den Menschen infektiösen Eier mit der Losung aus. Diese bleibt über Monate an der bodennah wachsenden Vegetation infektionsfähig. 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.
Es ist erst seit etwa zehn Jahren bekannt, dass dieser Parasit 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. Im Vorsorgeprinzip ist daher von einem solchen Zusammenhang auszugehen. Als potentielles Frühwarnsystem ist die Überwachung und Analyse der epidemiologischen Situation in der Fuchspopulation von großer Bedeutung. Eine möglichst genaue Kenntnis der zeitlichen und räumlichen Dynamik dieser Parasitose im natürlichen Lebensraum sowie der sie beeinflussenden Faktoren ist die unverzichtbare Grundlage für räumliche und zeitliche Risiko-bewertungen einschließlich Prüfung von Präventions- und Interventionsstrategien. Auch Modelle zu Risikovorhersagen sind denkbar. Ein völlig neuer Aspekt ist die Zuwanderung und Etablierung einer neuen Endwirtpopulation, bestehend aus dem Marderhund, im Osten des Landes.

Epidemiologische Analysen bei so heterogen verteilten Infektionen in Wildtierpopulationen, insbesondere bei Wirtswechselzyklen, sind sehr anspruchsvolles 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 Losungsproben die regionale epidemiologische Situation überwacht werden kann. Zur Verarbeitung dieser Daten wurden neue Analysekonzepte, auch unter Einbeziehung geographischer Informationssysteme, entwickelt und evaluiert.
Auf diesem Weg konnten Risikohabitatfaktoren für den Fuchs im Nordwesten Brandenburgs beschrieben werden. Die Prüfung ihrer Gültigkeit auch außerhalb dieser Region ist weiter Schwerpunkt. Die Restitution dieses Endemiegebietes nach Interventionsmaßnahmen wurde analysiert und es wurde gezeigt, dass Infektionen von Hunden und Katzen in der Region keine Rolle spielen. Darüber hinaus gelang der Nachweis einer deutlichen zeitlichen und räumlichen Dynamik dieser Parasitose bei Füchsen in Thüringen, einschließlich einer deutlichen Ausweitung hochendemischer Regionen. Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Frage nach Konsequenzen der Zuwanderung und Etablierung des Marderhundes für die epidemiologische Situation und die Expositionsverhältnisse für den Menschen.

5.2 NEOSPORA CANINUM

Die Neosporose zählt weltweit zu den am häufigsten diagnostizierten Ursachen für Rinderaborte. 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. Hier werden vor allem solche Projekte zur Neosporose des Rindes bearbeitet, die der Entwicklung, Evaluierung und Standardisierung von Verfahren zur Erkennung von Infektionen mit *N. caninum* dienen und anschließend Anwendung in epidemiologischen Studien finden.

Entwicklung und Methoden zum Nachweis von *N. caninum* bei abortierten Rinderföten

Schares, G.* und Conraths, F.J.

In infizierten Zwischenwirten kommt es zur obligat intrazellulären Vermehrung von *N. caninum*. Verantwortlich sind vor allem Tachyzoiten. Vermutlich ausgelöst durch die Immunantwort des Wirtes kommt es auch zur Ausbildung sich nur noch langsam vermehrender, enzystierter Stadien (Bradyzoiten). Bislang gibt es keine monoklonalen Antikörper, die enzystierte Bradyzoitenstadien von *N. caninum* Spezies-spezifisch erkennen. In Zusammenarbeit mit der Veterinärmedizinischen Fakultät in Madrid wurde daher damit begonnen, monoklonale Antikörper gegen ein rekombinantes Oberflächenantigen von *N. caninum*-Bradyzoiten (NcSRS4) herzustellen. Einer der generierten spezifischen Klone reagierte nicht nur mit dem rekombinanten Antigen, sondern auch mit nativen Bradyzoiten. Auch gegen ein Dichte-Granula-Antigen Nc-GRA7, das sowohl bei Tachyzoiten als auch in Bradyzoiten vorkommt, wurden mehrere monoklonale Antikörper hergestellt. Derzeit wird die Eignung dieser Antikörper für diagnostische Zwecke überprüft.

Studien zur geographischen Verteilung von *N. caninum*-Infektionen und zu möglichen Risikofaktoren

Schares, G.*, Staubach, C. und Conraths, F.J.

Die geographische Verteilung *N. caninum*-positiver Rinderherden in Bayern wurde zusammen mit dem Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. untersucht. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass – wie schon bei Studien in Rheinland-Pfalz – auch in Bayern Rinderherden in Landkreisen mit erhöhter Bevölkerungsdichte ein erhöhtes Risiko hatten, mit *N. caninum* infiziert zu sein.

Studie zur Rolle von *N. caninum* als Aborterreger beim Rind

Schares, G.*, Staubach, C., Ziller, M., Fröhlich, A. und Conraths, F.J.

In Rinderherden können *N. caninum*-assoziierte Abortgeschehen ausbruchsartig verlaufen. Diese seuchenhaften Abortgeschehen sind vermutlich auf Primärinfektion mit dem Erreger zurückzuführen. Aviditäts-ELISAs lassen eine Aussage über den Infektionszeitpunkt der Tiere zu und sind wichtig in epidemiologischen Studien, die die Infektionswege bei der bovinen Neosporose aufklären wollen. Um die Rolle von *N. caninum* als Ursache für seuchenhafte Abortgeschehen effizienter untersuchen zu können, wurde ein Aviditäts-ELISA so modifiziert, dass eine arbeitsaufwändige Titration der Seren nicht mehr notwendig ist. Mit dem neuen Verfahren kann der Aviditätsindex eines Serums mit einer einzigen Serumverdünnung zuverlässig bestimmt werden.

5.3 TOXOPLASMA GONDII

Untersuchungen zu protozoär bedingten Reproduktionsverlusten bei landwirtschaftlich genutzten Wiederkäuern

Schares, G.* und Conraths, F.J.

Differentialdiagnostisch spielen bei Reproduktionsverlusten landwirtschaftlich genutzter Wiederkäuer immer auch Infektionen mit dem Protozoon *Toxoplasma gondii* eine Rolle. Ein Verfahren wurde etabliert, mit dem sich das diagnostisch bedeutsame Toxoplasma-Tachyzoitenantigen TgSAG1 (p30) reinigen lässt. Mit Hilfe des gereinigten Antigens wurde ein ELISA zum Nachweis von *Toxoplasma gondii*-Infektionen in Zwischenwirten etabliert.

5.4 TRITRICHOMONAS FOETUS

Trichomonaden sind kleine einzellige Organismen (Flagellaten), die bei vielen Wild- und Haustieren nachgewiesen werden können. Meistens handelt es sich um apathogene Kommensalen oder sie verursachen relativ mild verlaufende Erkrankungen. Zu den klinisch bedeutsamen Angehörigen dieser Gruppe gehört die Spezies *Tritrichomonas foetus*, der Erreger der Trichomonadenseuche des Rindes. Der Erreger wird beim Deckakt übertragen. Während die Infektion beim Bullen in der Regel asymptomatisch verläuft, kann sie bei Kühen zu Vaginitis, Endometritis und Aborten führen. Bullen spielen eine bedeutende Rolle bei der Übertragung der Trichomonaden, da sie lebenslang Träger und Ausscheider des Parasiten sein können.
Die Diagnose der Trichomonadenseuche des Rindes erfolgt auf Grund gesetzlicher Vorgaben (Deutschland: Rinder-Deckinfektionen-Verordnung vom 3. Juni 1975) durch den direkten mikroskopischen Nachweis des Erregers in Spülproben oder anderen für die Untersuchung geeigneten Proben (z.B. abgestoßene Früchte, Eihäute, Vaginalsekret). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der Untersuchung mittels Erregeranzüchtung. Allerdings ist eine morphologische Unterscheidung des tierseuchenrechtlich relevanten Erregers *T. foetus* von anderen Trichomonaden nur bedingt möglich. Dies betrifft auch die nach Giemsa gefärbten Ausstrichpräparate, da es sich gezeigt hat, dass die Anzahl der Geißeln innerhalb derselben Art variieren kann. Für die Differenzierung sind molekularbiologische Methoden besser geeignet als die Anwendung morphologischer Kriterien. Eine PCR mit spezifischen Primern ermöglicht die Unterscheidung zwischen *T. foetus* und kontaminierenden Trichomonaden. Somit ist es möglich, positive Kulturresultate zu überprüfen und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Die PCR kann auch ohne vorangehende Kultur zur Untersuchung von Probenmaterial eingesetzt werden. Daher sollte die PCR als ergänzende Methode in die Gesetzgebung zur Tierseuchenbekämpfung Eingang finden und zur Differenzierung von Trichomonaden-Isolaten regelmäßig angewendet werden. Zu diesem Zweck sollten alle Trichomonaden-Isolate an das Nationale Referenzlabor für die Trichomonadenseuche des Rindes eingesendet und dort typisiert werden.

5.5 TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

Der einzellige Parasit *Trypanosoma (T.) equiperdum* ist der Erreger der Beschälseuche, einer meist chronisch verlaufenden klassischen Deckinfektion bei Equiden mit einer Inkubationszeit von unregelmäßiger Dauer, eventuell von mehreren Monaten. Der direkte Erregernachweis, auch mit molekularen Methoden, ist meist wenig Erfolg versprechend. Die Auseinandersetzung mit dem Erreger wird daher meist indirekt über einen erhöhten Antikörperspiegel diagnostiziert. Die enge Verwandtschaft des Erregers mit

Trypanosoma evansi, dem Erreger der „Surra" bei Kameliden und Equiden, kann jedoch zu Kreuzreaktivitäten bei serologischen Reaktionen führen. Da beide Erreger in Afrika, Asien und Lateinamerika vorkommen, kann dies zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung führen. Aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse über die genetische Ähnlichkeit der beiden Erreger weisen darauf hin, dass es sich bei *T. equiperdum* nicht um eine separate Spezies, sondern lediglich um einen wirtsadaptierten Typus von *T. evansi* handelt.

Verdacht einer Beschälseuche-Infektion beim Pferd – Vergleichende Untersuchung mit verschiedenen Methoden

Moser, I.* und Henning, K.

Der Nachweis von Antikörpern gegen *Trypanosoma* (*T.*) *equiperdum* führt in Deutschland dazu, dass das entsprechende Pferd isoliert gehalten und für die Zucht gesperrt werden muss, da mit Sicherheit verhindert werden soll, dass die durch *T. equiperdum* hervorgerufene, seit vielen Jahren in Deutschland getilgte Beschälseuche sich von Neuem verbreitet. Dies bedeutet einen hohen Wertverlust für den Tierbesitzer und in vielen Fällen das Todesurteil für das Pferd. Die eindeutige Feststellung der Infektion mit dem Erreger wird durch die enge Verwandtschaft von *T. equiperdum* mit *T. evansi* erschwert. Die Infektion mit *T. evansi* unterliegt beim Pferd nicht der Anzeigepflicht und hat folglich nicht die gravierenden tierseuchenrechtlichen Konsequenzen. Die beiden Infektionen sind auf Grund hoher Kreuzreaktivität der Erreger serologisch kaum zu unterscheiden. Bei Import von Pferden aus Risikogebieten, in welchen beide Erreger vorkommen, kann es daher zu erheblichen Schwierigkeiten kommen, das Vorliegen der anzeigepflichtigen Infektion mit *T. equiperdum* unzweifelhaft nachzuweisen. Die Komplementbindungsreaktion (KBR) ist an sich schon eine schwer standardisierbare, komplexe serologische Methode. Erschwerend kommt hinzu, dass weltweit keine definierten Erregerstämme und keine einheitlichen Kontrollseren verwendet werden. Weiterhin kann der Erreger die immunologische Abwehr des Wirtes unterlaufen, indem er seine Oberflächenantigene verändert (Antigen-Drift), so dass zwischen einzelnen Antigenchargen Unterschiede in der immunologischen Wirksamkeit auftreten können. Daher wurden mit den Seren von zwei aus der Mongolei importierten Pferden mit mittlerem (1:40) bzw. hohem (1:640) KBR-Titer gegen das in Deutschland zugelassene Beschälseuche-Antigen weitere Antigene und Methoden vergleichend untersucht. Auch zwei weitere europäische Labors waren an diesen Untersuchungen beteiligt, das OIE-Referenzlabor in Moskau, Russland, sowie die Abteilung „Funktionelle Genetik der Trypanosomatiden" der Universität Victor Ségalen in Bordeaux, Frankreich.

1. KBR-Untersuchungen des Nationalen Referenzlabors mit
   - einer definierten Charge des in Deutschland zugelassenen Antigens,
   - einer definierten Charge des in den USA (USDA) zugelassenen Antigens und
   - des im OIE-Referenzlabor in Moskau verwendeten Antigens.

   Alle drei Antigene führten in unseren Händen mit beiden Seren zu mittel- bzw. hochgradig positiven Ergebnissen.
2. KBR-Untersuchungen des OIE-Referenzlabors mit
   - dem dort zugelassenen Antigen und
   - einer definierten Charge (s.o.) des in Deutschland zugelassenen Antigens.

   Beide Antigene führten mit beiden Seren im OIE-Referenzlabor zu negativen Resultaten.
3. ELISA-Untersuchung des Nationalen Referenzlabors mit
   - einem in den USA (USDA) entwickelten Test unter Verwendung einer definierten Charge des in den USA zugelassenen Antigens.

   Mit beiden Seren wurden in unseren Händen positive Ergebnisse erzielt.
4. Immunoblot-Untersuchungen des Nationalen Referenzlabors mit
   - dem in Deutschland zugelassenen Antigen aus in Ratten propagierten Erregern und
   - *Trypanosoma-equiperdum*-Antigen aus *in vitro* kultivierten Erregern.

   Beide Untersuchungen erbrachten für das hochtitrige Serum (KBR) ein deutlich positives und für das schwächer positive Serum (KBR) ein schwach-positives Ergebnis.
5. Immunoblot-Untersuchungen der Abteilung „Funktionelle Genetik der Trypanosomatiden" der Universität Victor Ségalen in Bordeaux mit
   - dem in Frankreich zugelassenen Antigen.

   Mit dem hochtitrigen Serum wurde ein deutlich positives und mit dem schwächeren Serum ein schwach positives Ergebnis erzielt.

Die Diskrepanzen zwischen den KBR-Ergebnissen des OIE-Referenzlabors und den Ergebnissen des Nationalen Referenzlabors am FLI konnten bisher nicht geklärt werden. Allerdings weisen die positiven Ergebnisse, die mit anderen Methoden als der KBR erzielt wurden darauf hin, dass es sich um positiv zu bewertende Seren handelt. Der Bedarf an besser standardisierten und/oder neuen Diagnostikmethoden wird betont.

6 MYKOPLASMEN

Mykoplasmen gelten als die kleinsten selbst-replizierenden Mikroorganismen und besitzen im Unterschied zu den Eubacteria eine Lipid-Doppelschicht anstelle der Zellwand. Ihr relativ kleines Genom (typischerweise 0,54 bis 1,3 Mbp) und die daraus resultierende begrenzte Kodierungskapazität bedingt eine Lebensweise als Oberflächenparasit unter Nutzung essentieller Substrate der Wirtszelle. Dennoch verfügen viele Mykoplasmenarten, unter ihnen *Mycoplasma bovis*, der Erreger von therapieresistenter Mastitis, respiratorischen Erkrankungen und Arthritis beim Rind, über umfangreiche komplexe Maschinerien zur Antigenvariation, die den Erreger zur Täuschung und Unterwanderung der Immunabwehr des Wirtes befähigen. Daher sind Behandlung und Bekämpfung von Mykoplasmen-erkrankungen bei Tier und Mensch meist mit Schwierigkeiten verbunden.

Nachweis der Oberflächenantigen-Variation bei *Mycoplasma bovis* nach experimenteller respiratorischer Infektion in Kälbern

Sachse, K.*, Hotzel, H., Dell'Ariccia, A., Reinhold, P., Schubert, E., Liebler-Tenorio, E. und Yogev, D.

Neben dem klinischen Verlauf beobachtet man bei *Mycoplasma-bovis*-Infektionen häufig auch subklinische und chronische Abläufe, bei denen das Agens im Wirtsorganismus über Monate und sogar Jahre persisitieren kann. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Fähigkeit dieser Mykoplasmenart zur Variation der Oberflächenantigene (Vsps) ein Schlüsselfaktor bei der Erreger-Wirt-Wechselwirkung sein kann.
In einem kürzlich durchgeführten Belastungsexperiment wurde bei Kälbern durch Exposition mit Aerosol aus einer *M.-bovis*-Kultur eine milde Pneumonie erzeugt. Dabei kam es nicht zu sichtbaren Gewebeveränderungen in der Lunge. In der Histologie wurde eine milde interstitielle Pneumonie nach sieben Tagen beobachtet. Diese schwächte sich bei den nachfolgenden Tieren (14 und 21 Tage p.i.) ab und war am Tage 35 p.i. nicht mehr nachweisbar. Das benutzte Infektionsmodell spiegelt nach unserer Überzeugung die natürlichen Infektionsbedingungen wider, welche ebenfalls zu subklinischen Effekten führen. Zur Verfolgung der Ausbreitung des Erregers und möglicher Antigenvariation wurden an den Tagen -2, 0, 3, 7, 10, 14, 21 und 35 p.i. jeweils Nasentupfer kultiviert, ebenso Proben von Lungengewebe und anderen Organen nach der Tötung. Die Expression der Vsp-Antigene wurde anhand von Kolonie-Immunoblots der Reisolate verfolgt. Die humorale Immunantwort setzte ca. 10 Tage p.i. ein.
Der Infektionsstamm konnte aus Nasentupfern noch bis 10 Tage p.i. reisoliert werden; aus Lunge, Trachea, Tonsillen und Lungenlypmhknoten gelang dies noch bis 35 Tage p.i. Mit fortschreitender Infektion wurden Veränderungen im Vsp-Expressionsmuster der *M.-bovis*-Reisolate beobachtet. Diese Daten belegen das Vorkommen von Phasenvariationen der Vsp-Antigene *in vivo*.

Weitere Projekte

Pathologie und Pathogenese der respiratorischen Veränderungen nach aerogener Inokulation von Kälbern mit *Mycoplasma bovis*

Liebler-Tenorio, E.M., Reinhold, P. und Sachse, K.

7 PATHOPHYSIOLOGIE UND LUNGENFUNKTIONSDIAGNOSTIK

Methodische und biologische Einflussfaktoren auf die Gewinnung und Zusammensetzung von Atemkondensat

Reinhold, P.*, Jäger, J., Schröder, C. und Knobloch, H.

Zur Untersuchung pathologischer Veränderungen im Organismus steht die Nutzung biologischer Marker (Biomarker) im zunehmenden Interesse von Human- und Veterinärmedizinern. Da die Sammlung von Ausatemluft eine komplett nicht-invasive, wiederholbare, und von der Kooperation des Patienten

unabhängige Probengewinnung darstellt, ist die Analyse der Ausatemluft ein diagnostisches Verfahren, dem gegenwärtig sehr viel Aufmerksamkeit geschenkt wird, um Biomarker nicht-invasiv überwachen zu können. Das Kondensat der ausgeatmeten Luft (Atemkondensat) wird - entsprechend der Empfehlung einer internationalen Task Force der European Respiratory Society und der American Thoracic Society - vorzugsweise als EBC (exhaled breath condensate) bezeichnet.
Zur diagnostischen Nutzung der Ausatemluft existieren noch zahlreiche Unklarheiten bezüglich der Gewinnung und der Analyse von EBC. Das Ziel der vorliegenden Studie war, die bedeutsamsten methodischen Einflussfaktoren auf die Gewinnung von Atemkondensat anhand eines Tiermodells (gesunde Kälber und Schweine) zu evaluieren. Zwecks Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Spezies wurde das EBC-Sammelgerät verwendet, welches in der Humanmedizin am gebräuchlichsten ist ("ECoScreen"). Spezies-vergleichend wurden folgende Aspekte untersucht: (a) eine mögliche Beeinträchtigung der Lungenfunktion durch den Prozess der EBC-Gewinnung, (b) methodische und biologische Einflussfaktoren auf die EBC-Gewinnung unter Spontanatmung, und (c) die Abhängigkeit der Zusammensetzung des Atemkondensates von Bedingungen der EBC-Gewinnung.
An beiden Tierarten wurden insgesamt 352 EBC-Proben gesammelt, wobei parallel zu jeder EBC-Gewinnung die Kenngrößen der Lungenbelüftung (Ventilation) mittels eines elektronischen Spirometers erfasst wurden. Der Kohlendioxid-Partialdruck (pCO_2) und der pH-Wert im EBC wurden im nativen EBC unmittelbar nach Gewinnung und ohne vorherige Entgasung mittels eines Blutgasanalysators bestimmt. Eine Bestimmung der Protein-Konzentration im EBC erfolgte colorimetrisch. Kenngrößen der Lungenfunktion wurden an beiden Tierarten vor und nach EBC-Gewinnung erfasst (Impuls Oszilloresistometrie System).
Der Prozess der EBC-Gewinnung hat keinen negativen Einfluss auf die Lungenfunktion. Das Volumen an EBC, welches pro Zeiteinheit zu gewinnen ist, hängt in erster Linie von der Ventilationsleistung der Lunge pro Zeiteinheit ab. Spezies-spezifisch gelten zusätzliche Abhängigkeiten der EBC-Gewinnung von weiteren Kenngrößen der Lungenbelüftung (z. B. maximale Strömungsgeschwindigkeit der ausgeatmeten Luft oder exspiratorisches Atemzugvolumen pro kg Körpermasse). Die Protein-Konzentration im EBC stieg mit zunehmendem Exspirationsvolumen pro Zeit und mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit der ausgeatmeten Luft an. Obwohl der pCO_2 des Atemkondensates negativ mit der Dauer der EBC-Gewinnung korreliert und demzufolge tierartlich signifikant verschieden war, wurden bei beiden Tierarten vergleichbare ‚physiologische' pH-Werte im EBC gemessen (5,6 – 6,2).
Die in der Studie gewonnen Daten und Erkenntnisse sind für die Standardisierung des Gewinnungsprozesses von Atemkondensat bei verschiedenen Spezies bedeutsam. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die physiologischen Zusammenhänge und die diagnostische Nutzbarkeit für verschiedene im EBC messbare potenzielle Biomarker aufzuklären.

Weitere Projekte

Einfluss chlamydialer Infektionen auf den Gasaustausch der Lunge
Reinhold, P. und Kneucker, A.

Evaluierung des Atemkondensates als diagnostisches Medium
Reinhold, P., Schröder, C. und Knobloch, H.

Anwendung der Kapnovolumetrie zur Erfassung von ventilatorischen Verteilungsstörungen beim Kalb
Reinhold, P. und Reißig, S.

Optimierung der Impuls-Oszilloresistometrie zur Erfassung und Beurteilung von Erkrankungen der peripheren Atemwege bei Kalb und Schwein
Reinhold, P., Jäger, J. und Reichel, T.

Charakterisierung von Lungenfunktionsstörungen bei der *Mannheimia haemolytica* Infektion des Kalbes
Reinhold, P. und Seifert, J.

8 ZELLBANK UND VIRUSSTAMMHALTUNG

8.1 ZELLBANK FÜR ZELLLINIEN IN DER VETERINÄRMEDIZIN

Riebe, R.* und Lenk, M.

Aufnahme neuer Zelllinien in die Zellbank (ZB):

Im Berichtszeitraum wurden 39 Zelllinien in die ZB aufgenommen. Dabei handelt es sich um:

- 8 etablierte Linien aus anderen wissenschaftlichen Einrichtungen des In- und Auslandes (Mensch, Maus, Huhn),
- 14 Neuanzüchtungen in der ZB, deren Linienentwicklung nicht abgeschlossen ist (Maus, Elefant, Kaninchen, Schwan, Stockente),
- 15 gentechnisch veränderte Linien verschiedener Arbeitsgruppen des FLI und anderer Institute,
- 2 Hybridome aus Arbeitsgruppen des FLI.

Aktueller Linienbestand der ZB:

- 1.039 Zelllinien von 46 Tierspezies (Stockente hinzugekommen) und Mensch

Abgaben aus der Zellbank:

Im Berichtszeitraum erfolgten 1.379 Zellabgaben von etwa 230 verschiedenen Zellsystemen an folgende Nutzer:

- 200 Abgaben von 163 verschiedenen Zelllinien an Institute in Deutschland, Portugal, Frankreich, Schweiz, Israel, USA, England, Ägypten, Tschechien, Schweden, Vietnam, Estland, Belgien, Australien, Thailand und Bulgarien.
- 1.179 Abgaben von 200 verschiedenen Zellsystemen an die Institute des FLI.
- Neben etablierten Zelllinien wurden kontinuierlich Primärzellen (embryonale Hühnerfibroblasten und -nieren) und primärnahe Kultursysteme aus Kryovorräten (z.B. Ferkel- und Kälbernieren, Kälberschilddrüsen u.a.) zur Verfügung gestellt (insgesamt 8,7 Liter Zellsuspension).
- Es wurden insgesamt 3.376 Liter von mehr als 35 verschiedenen Zellzuchtmedien und -lösungen gebrauchsfertig bereitgestellt. Der dazu notwendige Serumverbrauch betrug 217 Liter FKS und 12 Liter Rinderserum eigener Herstellung, umfangreiche Serumprüfungen inbegriffen.

Arbeiten zur Zellcharakterisierung und Standardisierung:

- Bestimmung der allgemeinen Wachstumscharakteristika der Neuaufnahmen und Neuanzüchtungen;
- regelmäßige Charakterisierung der Linien durch Karyotypisierung (Ermittlung der Stemline, Erstellung von Karyogrammen), 15 Linien im Berichtszeitraum;
- wöchentliche Mykoplasmenkontrolle aller sich in Kultur befindlichen Zelllinien mit Kulturmethode, DNS-Färbung und PCR (2.244 Einzeluntersuchungen an 179 Zelllinien in Zusammenarbeit mit dem Bakteriologischen Labor, U. Polster);
- regelmäßige Fremdviruskontrolle mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik, PCR und Elektronenmikroskopie (Labor Dr. habil. H. Granzow) unter anderem zum bevorzugten Nachweis von BVD-Virus (ständige Kultivation verschiedener hochempfänglicher Suchlinien);
- regelmäßige Blutung der zellbankeigenen Rinder und Herstellung hochwertiger, sicher BVDV-freier Zellzuchtseren;
- Anlegen von Kryokonserven (1.238 Ampullen á 1 ml von 107 verschiedenen Linien im Berichtszeitraum);
- regelmäßige Authentizitätskontrollen (cell typing). Folgende Methoden kamen hierbei zum Einsatz (DNA-Untersuchungen): PCR-RFLP, Sequenzierung (mitochondriale DNS, Ausschnitt des Cytochrom b-Gens), Analyse der Länge des Intron G des Aldolasegens (PCR) und speziesspezifische PCR (CIB-A-Kit/Cibus Biotech GmbH). Bei ausgewählten Fragestellungen wird eine Isoenzymanalyse mit einbezogen. Fehldeklarationen hinsichtlich der Herkunftsspezies wurden bei mehreren extern bezogenen Linien festgestellt. Aktuelle Informationen werden zukünftig unter http://www.fli.bund.de (Institute/Institut für Infektionsmedizin / Zellbank) zur Verfügung gestellt.

Weitere Arbeiten:

- Arbeiten zur weiteren Linienentwicklung bereits vorgestellter Neuanzüchtungen konnten erfolgreich fortgeführt werden. Durch Alteration zur Permanenz sind einige neue, international bisher nicht verfügbare, permanente Zelllinien entstanden: z.B. europäischer Feldhase (Niere, Milz), Leopard (Niere), Lama (Nabelvenenendothel, Plazenta), Schwein (Plexus chorioidei), Trampeltier (Plazenta), Kaninchen (Knochenmark, Leber, periphere Blutzellen), Maus (Embryofibroblasten, PrP^{o}–Mauslinien), Elefant (Nabelschnur).
- Für das WHO-Tollwut-Referenzzentrum und zur Weitergabe an Dritte wurden mehrere Liter an monoklonalen Antikörpern in Form von Zellkulturüberständen von 5 verschiedenen Hybridomen bereitgestellt.

Nach MKS-Virus-Empfänglichkeitsstudien an diversen Zelllinien von Rind, Schaf und Ziege sowie primären Kälberschilddrüsenzellen erwies sich eine Linie vom Zungenepithel der Ziege (ZZ-R, CCLV 127) als besonders empfänglich. Sie wurde für weiterführende Untersuchungen bereitgestellt.

Mykoplasmen und Zellkulturen – Untersuchungen zur Diagnostik und Bekämpfung
Polster, U.*

Die Kontamination von biologischem Material, wie z.B. Zellkulturen und Viruspräparationen, mit Mykoplasmen sind nach wie vor ein Problem, das nur durch eine regelmäßige bakteriologische Kontrolle zu beherrschen ist (Kultur, PCR, DNA-Färbung). Die meisten Kontaminationen sind auf mit Mykoplasmen verunreinigte Zellkulturen und Virusanzüchtungen zurückzuführen. Insgesamt wurden im Berichtszeitraum 2.822 Zellkulturen und Virusproben auf das Vorkommen von Mykoplasmen untersucht. 27 dieser Proben waren positiv (0,96 %). Es wurden *Mycoplasma (M.) arginini*, *M. hyorhinis*, *M. synoviae* sowie *Acholeplasma laidlawii* gefunden. Gyrasehemmer sind nach wie vor das Mittel der Wahl zur Sanierung kontaminierter Zellkulturen.

8.2 VIRUSSTAMMHALTUNG (RIEMSER VIRUSBANK)

Dauber, M.*

Die Riemser Virusbank (RVB) fungiert als zentrale Einrichtung mit der Aufgabe, authentische, für die Veterinärmedizin bedeutsame Virusstämme unter definierten Bedingungen zu sammeln, zu konservieren, zu pflegen und zu dokumentieren. Virusstämme und zum Teil homologe Antiseren werden für das FLI sowie für andere Einrichtungen des In- und Auslandes bereitgestellt und zertifiziert abgegeben. 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 mit guter Datenlage, deren Herkunft, Identität und Kontaminantenfreiheit (einschließlich Mykoplasmen und Fremdviren) bekannt bzw. geprüft ist, aufgenommen. Die Virusbank veranlasst diese Prüfung bei Notwendigkeit und kontaminierte Stämme werden möglichst saniert. Für die *In-vitro*-Vermehrung von Virusstämmen werden in Zusammenarbeit mit der Zellbank optimale Zellkultursysteme ausgewählt. Dabei wird auf möglichst weitgehend charakterisierte diploide oder permanente Zelllinien zurückgegriffen. Die Virusbank ist außerdem in der Lage Virusstämme mit Weitergabebeschränkung zu deponieren.
Im Bestand der Virusbank befinden sich gegenwärtig mehr als 630 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. Der Bearbeitungsstand ist unterschiedlich. Ein repräsentativer Teil der vorhandenen Virusstämme ist soweit bearbeitet worden, dass diese kurzfristig abgegeben werden können. Virusmaterial, das vorrangig zum Zwecke der Dokumentation verwahrt wird, wurde ohne umfangreiche Überprüfung archiviert und befindet sich derzeit im Wesentlichen noch im Zustand wie zur Zeit seiner Übergabe an die Virusbank. Im Berichtsjahr wurden etwa 33 verschiedene Virusstämme abgegeben, diese zum Teil mehrmals an verschiedene Adressaten. Empfänger waren dreizehn verschiedene Einrichtungen des In- und Auslandes, darunter Untersuchungsämter, Forschungsinstitute bzw. Universitäten und private Firmen.

Entwicklung und Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Fischviren
Dauber, M.*, Bergmann, S.M., Fichtner, D. und Schütze, H.

Die Generierung von monoklonalen Antikörpern (mAks) wurde fortgeführt. Insgesamt wurden damit mAks zum Nachweis der folgenden fischpathogenen Viren hergestellt:

Alloherpesviridae:	Koi-Herpesvirus (Cyprinides Herpesvirus 3, CyHV-3, KHV) Anguillides Herpesvirus 1 (AngHV-1, HVA)
Birnaviridae:	Virus der Infektiösen pankreatischen Nekrose (IPNV)
Iridoviridae:	European Sheatfish Virus (ESV) European Catfish Virus (ECV) Virus der Epizootischen hämatopoetischen Nekrose (EHNV)
Orthomyxoviridae:	Virus der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV)
Rhabdoviridae:	Virus der Viralen hämorrhagischen Septikämie (VHSV) Virus der Infektiösen hämatopoetischen Nekrose (IHNV) Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV)
Togaviridae:	Salmon pancreas disease virus (SPDV) Sleeping disease virus (SDV)

9 INFORMATIK, BIOSTATISTIK, DOKUMENTATION

Anpassung, Umsetzung und Betreuung des EU-Projektes „Trade Control and Expert Systems" (TRACES) in Deutschland
Micklich, A.*, Schröder, R. und Klöß, D.

TRACES ist ein EDV-Projekt der EU-Kommission, mit dem Transporte von Tieren und Produkten tierischer Herkunft innerhalb der EU sowie von Drittländern (Drittlandimporte) dokumentiert werden. 2006 wurden mehrere neue Versionen eingeführt, die einen hohen logistischen und Betreuungsaufwand erforderten. Seitens des FLI wurden mehrfach verschiedene Verbesserungsvorschläge eingereicht, die teilweise in neuen Programmversionen berücksichtigt wurden.
Für die technische Umsetzung und Betreuung ist auf Bundesebene das FLI Wusterhausen, Institut für Epidemiologie, zuständig (Bezeichnung innerhalb von TRACES „Memberstate Administrator").

Internationale Tierseuchensurveillance und Untersuchungen zum Einschleppungsrisiko von Tierseuchen durch die Einfuhr von lebenden Tieren und bestimmten Waren tierischer Herkunft
Kramer, M.* und Unger, F.

Tierseuchen und Tierkrankheiten mit erheblicher wirtschaftlicher und zoonotischer Bedeutung sind nach wie vor in vielen Regionen der Welt endemisch verbreitet. Die Globalisierung und damit die immer enger werdenden wirtschaftlichen Verflechtungen, auch beim Handel mit lebenden Tieren und Produkten tierischer Herkunft, sowie der intensive Tourismus- und Geschäftsreiseverkehr erhöhen bestimmte Risiken der Einschleppung von Tierseuchenerregern, auch aus entlegenen Gebieten der Welt, nach Deutschland. Die langjährige Beobachtung und Bewertung der internationalen Tierseuchensituation unter Verwendung internationaler Datenbanken und Informationssysteme (z.B. OIE, TRACES, Eurostat, ADNS, Handistatus 2, etc.), aber auch Angaben aus Ländern dienen dem Ziel, Gefährdungspotentiale zu erkennen und Einschleppungsrisiken zu bestimmen, um daraus Empfehlungen zum Risikomanagement abzuleiten.
Die Einfuhr von lebenden Tieren und Waren tierischer Herkunft aus Regionen oder Ländern mit berichtetem Vorkommen bestimmter Tierseuchen stellt ein permanentes Risiko für die Einschleppung dieser Krankheiten in das Bundesgebiet dar. Während in der Vergangenheit Länder, in denen bestimmte Tierseuchen, insbesondere die der ehemaligen Liste A, auftraten, vom Handel ausgeschlossen wurden, greifen heute zunehmend Regionalisierungskonzepte nach WTO- oder OIE-Kriterien. Das führt immer mehr dazu, dass vom Prinzip des "Null-Risikos" abgegangen und sich eher zu einem Risikomanagement auf der Basis einer Einfuhr-Risikoanalyse hingewendet wird.
Die dabei verwendeten Modelle und Daten sind jedoch sehr unterschiedlich in ihrer Anwendbarkeit, so dass zunächst die Eignung bestimmter Daten und Statistiken, wie Ein- und Ausfuhrstatistiken, Tierseuchendaten, Handelsströme etc. untersucht werden muss. Anschließend werden Szenarien entworfen

und die dabei auftretenden Wahrscheinlichkeiten berechnet, unter denen der jeweilige Erreger einen empfänglichen Wirt findet. Dabei werden die Wahrscheinlichkeiten des Erregereintrages bei lebenden Tieren und bei Waren unter Verarbeitungsbedingungen berücksichtigt. Letztendlich können diese Risikobewertungen dazu beitragen, Einfuhrentscheidungen zu unterstützen.

Anwendung geographischer Informationssysteme und raumbezogener statistischer Methoden in der Veterinärepidemiologie

Klöß, D., Müller, T., Schröder, R., Selhorst, T., Staubach, C.*, Tackmann, K., Teuffert, J., Vesely, J., Ziller, M. und Conraths, F.J.
(in Zusammenarbeit mit Thulke, H.-H. [Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle]; Schach, U. [Universität Dortmund]; Held, L. und Schmidt, V. [Universität München]; Stoyan, D. [Universität Freiberg]; Hugh-Jones, M. [Louisiana State University, USA]; Franke, C.R. [Universität von Bahia, Tierärztliche Hochschule, Salvador, Brasilien])

Geographische Informationssysteme (GIS) und räumliche Epidemiologie spielen eine immer größere Rolle bei der Tierseuchenbekämpfung. Seit geraumer Zeit werden in den Veterinär- und Untersuchungsämtern der Bundesrepublik Deutschland und anderer EU-Mitgliedsstaaten (z.B. Niederlande, Vereinigtes Königreich, Dänemark) GIS in der praktischen Tierseuchenbekämpfung angewendet. Einsatz finden GIS vor allem bei Ausbrüchen anzeigepflichtiger Tierseuchen. Sie unterstützen den Amtstierarzt bei der Definition von Sperrgebieten, Bestandszählungen wie auch der Planung der Bekämpfung von Tierseuchen. Mit Hilfe von GIS und neuer statistischer Analysemethoden können die räumliche und zeitliche Ausbreitung von Tierseuchen untersucht und Risiken beschrieben werden. Exakte Punktkoordinaten (z.B. Gehöfte) wurden verwendet, um das Risiko der Ausbreitung der Klassischen Schweinepest im 1.000 m Radius zu beschreiben und die Anzahl Betriebe und Tiere in Restriktionszonen in Abhängigkeit von der Anzahl der Ausbrüche in unterschiedlich tierdichten Gebieten ungefähr abzuschätzen. In Zusammenarbeit mit der Universität Freiberg wurden neue GIS Analyseroutinen und statistische Methoden entwickelt, um den Zusammenhang zwischen Umwelt und dem Auftreten von Krankheiten besser zu beschreiben. Am Beispiel von Daten zu *Echinococcus multilocularis* beim Fuchs wurden die Ergebnisse mit denen eines raumbezogenen logistischen Regressionsmodells verglichen. Aggregierte Daten, basierend auf administrativen Einheiten und regelmäßigen Zeiträumen der Berichterstattung, sind häufig der einzig mögliche Weg, um Wildtierkrankheiten in Zeit und Raum zu beobachten. In Zusammenarbeit mit der Universität München wurde versucht, die gebietsspezifische Prävalenz der Erkrankung, den zeitlichen Trend sowie den Einfluss von Umweltfaktoren mit Hilfe von Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Simulationstechniken innerhalb eines Bayesianischen statistischen Modells zu schätzen. Mittlerweile konnten umfangreiche Tools zur Datenaufbereitung und statistischen Analyse etabliert und validiert werden. Daten zur Schweinepest bei Wildschweinen und *Echinococcus multilocularis*-Infektion des Fuchses dienten als Beispiele für Überwachungsdaten in Raum und Zeit. Im Rahmen eines Twinning-Projektes in der Slowakei sowie bei Untersuchungen zur Effizienz der oralen Immunisierung bei Wildschweinen in Deutschland konnte der Nutzen und Vorteil der neuen Analysetechniken belegt werden.

Computergestützte Simulation von Wildtierkrankheiten (Klassische Schweinepest des Schwarzwildes)

Kaden, V., Klöß, D., Selhorst, T., Staubach, C.*, Vesely, J. und Ziller, M.
(in Zusammenarbeit mit Stubbe, C., Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft; Stärk, K., Bundesamt für Veterinärwesen, Bern, Schweiz)

Zur Unterstützung der laufenden Impfkampagnen und für die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien wurde ein computergestütztes Modell der Populationsdynamik von Wildschweinen entwickelt, mit welchem der Verlauf der Klassischen Schweinepest (KSP) in diesen Populationen unter verschiedenen Kontrollstrategien durchgespielt werden kann. Besondere Beachtung fanden dabei

a) die Saisonalität der Populationsdynamik (Geburten, Abschuss, Fallwild etc.),
b) das Sozialverhalten der verschiedenen Altersklassen und Geschlechter und
c) die virologischen und serologischen Parameter der KSP-Infektion.

Ferner nutzt das Modell zur Erlangung maximaler Realitätsnähe verschiedene Techniken wie z.B.

a) die stochastische Simulation von Ereignissen,
b) die Modellierung in diskreten Zeitschritten und
c) die Modellierung von Infektionsgemeinschaften.

Seit Mitte 1997 wird das Modell in enger Zusammenarbeit mit Virologen und Wildbiologen entwickelt. Anhand zeitlich und räumlich geschichteter Daten aus Wildschweinepest-gefährdeten Bezirken verschiedener Bundesländer und der Schweiz wurde eine Anpassung und Evaluation des Populationsmodells durchgeführt. Felddaten aus der Schweiz, Luxemburg und Deutschland (Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz) werden für die Sensitivitätsanalyse und Validierung des KSP-Infektionsmodells verwendet. Mit Hilfe dieses Simulationstools wurden im Rahmen von Twinning-Projekten mit Slowenien und der Slowakei Populationsangaben und -modelle überprüft. Um allgemeine epidemiologische Fragestellungen besser klären zu können, wurde parallel mit der Entwicklung eines Differentialgleichungsmodells in Anlehnung an SIR-Modelle begonnen. Dies umfasst auch eine effektivere Lösung der Gleichungssysteme.

Gemeinsame Datenbank über die epidemiologische Situation der Schweinepest bei Wildschweinen in Frankreich, Belgien, den Niederlanden, Luxemburg und Deutschland
Klöß, D., Kramer, M., Kroschewski, K., Schröder, R., Conraths, F.J. und Staubach, C.*

Im September 2002 wurde in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe zur Schweinepest bei Wildschweinen der Europäischen Kommission die Entwicklung eines einzeltierbasierten Datenbanksystems zur epidemiologischen Situation der Schweinepest bei Wildschweinen in Frankreich, Belgien, den Niederlanden, Luxemburg und Deutschland (Bundesländer Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz und Saarland) begonnen. Die Datenbank wurde als Internet-Projekt realisiert und erlaubt die Dateneingabe sowie die Auswertung der Untersuchungsdaten allein über einen Internet-Browser. Der Zugang zur Internet-Seite ist durch Sicherheitsmechanismen geschützt. Die Nutzer müssen sich über Nutzernamen und Passwörter eindeutig identifizieren. Alle von den EU-Mitgliedsländern benannten Benutzer der Datenbank können den Datenbankinhalt lesen und auswerten, aber nur eine definierte Nutzergruppe kann die Daten des jeweils eigenen Landes verändern (hinzufügen, editieren oder löschen). Die Dateneingabe umfasst die Charakterisierung des einzelnen Wildschweins (Geschlecht, Alter, Todesursache und Lokalisation) sowie die Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchung (Virologie und/oder Serologie) und kann sowohl über eine HTML-Maske im Browser als auch durch Upload über eine Batch-Datei für größere Datenmengen erfolgen. Zu diesem Zwecke wurden entsprechende Schnittstellen zu Datenbanksystemen der Untersuchungseinrichtungen geschaffen. Neben der tabellarischen Auswertung, stratifiziert nach Zeitraum, administrativen Einheiten (z.B. Mitgliedsstaat, Bundesland, Kreis), Altersklassen, Resultaten, erlaubt ein Internet-Kartenserver auch die Darstellung der Untersuchungsergebnisse in Form von Karten unter Berücksichtigung der administrativen Grenzen und topographischen Gegebenheiten. Die Erweiterung der Kartenfunktionalität durch die Implementierung des Karten-Explorers erlaubt nun die Zusammenführung der Laborresultate mit den Gebietskulissen.

Untersuchungen zur Genauigkeit datenbasierter Vorhersagen
Ziller, M.*

In Epidemiologie und Risikobewertung spielen datenbasierte Vorhersagen eine wesentliche Rolle. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass Simulationen oder auch experimentelle Studien häufig auf der Basis einer zu geringen Datengrundlage durchgeführt werden. Trotzdem werden daraus teilweise weitreichende Schlussfolgerungen gezogen und Vorhersagen getroffen, ohne deren Unsicherheit zu berücksichtigen. Deshalb sind unabhängige Methoden erforderlich, die die Aussagequalität bzw. Sicherheit der Schlussfolgerungen und Prognosen unter diesen Bedingungen quantifizieren.
Im Ergebnis theoretischer Untersuchungen konnten Maße für die relative Genauigkeit datenbasierter Vorhersagen definiert und weiterentwickelt werden. Anhand verschiedener Beispiele konnte demonstriert werden, dass die Verwendung dieser Maße eine präzisere und objektivierte Interpretation der Ergebnisse aus Vorhersagestudien ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass das in der Praxis häufig verwendete Weglassen von Ausreißern nur scheinbar zu einer genaueren Vorhersage führt. Tatsächlich wird dadurch aber der Zeithorizont für eine akzeptable Vorhersage verkürzt. Darüber hinaus wurden Modellwahlkriterien für Vorhersageprobleme erarbeitet, die die klassischen Kriterien der Anpassungsgüte ergänzen. Weiterführende Untersuchungen betreffen neben Modellwahl insbesondere die optimale Versuchsplanung bei Vorhersageproblemen.

Vorhersagen mit epidemiologischen Modellen
Koerkel, S., Vesely, J. und Ziller, M.*

Beim Beobachten eines epidemiologischen Geschehens stellt sich fast zwangsläufig die Frage nach der weiteren Entwicklung, um ggf. geeignete Vorsichts- oder Bekämpfungsmaßnahmen einleiten zu können. Die mathematische Beschreibung des zeitlichen Verlaufs einer Epidemie erfolgt hier durch kontinuierliche, dynamische Modelle. Diese bauen auf dem klassischen SIR-Modell auf und schließen je nach Problemlage geeignete Erweiterungen ein. Die zeitliche Änderung der epidemiologischen Kenngrößen wird dabei durch ein Anfangswertproblem gewöhnlicher Differentialgleichungen beschrieben. Wesentliche dynamische Eigenschaften können so abgebildet und ein hoher Allgemeinheitsgrad erreicht werden.
Die Modellparameter werden mit Hilfe nichtlinearer Optimierungsverfahren angepasst. In jedem Iterationsschritt ist dabei die numerische Integration des Differentialgleichungssystems erforderlich. Bei Verwendung derartiger Modellergebnisse für eine Vorhersage sind wenigstens zwei Aspekte der Unsicherheit zu berücksichtigen. Die Unsicherheit der Schätzung wird durch entsprechende Vorhersageintervalle quantifiziert. Obwohl ein Modell den tatsächlichen Zusammenhang innerhalb der gegebenen Datenregion ausreichend genau beschreiben kann, gibt es keine Evidenz für dessen Validität außerhalb dieses Bereiches. Deshalb wird die relative Genauigkeit der Vorhersage als ein zusätzliches Maß der Ungewissheit herangezogen. Sie impliziert Informationen über den Vorhersagehorizont, innerhalb dessen die Modell-Validität auf einem bestimmten Niveau akzeptiert werden kann. Bei Unterschreitung eines vorher festgelegten Minimalniveaus der relativen Vorhersagegenauigkeit ist das betreffende Modell dann nicht mehr zur Vorhersage geeignet.

Untersuchungen zur Robustheit ausgewählter statistischer Methoden in der Risikobewertung
Fröhlich, A., Selhorst, T., Staubach, C., Vesely, J. und Ziller, M.*

Verschiedene Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Risiken werden in der Praxis auch in Situationen angewendet, bei denen entscheidende Voraussetzungen für die Verfahren verletzt sind. Verzerrte Schätzungen sowie Irrtümer bei der Suche nach Auffälligkeiten in den Daten können so zu erheblichen Fehleinschätzungen in der Risikobewertung führen.
Beispielhaft wurde die Quantifizierung von Risiken mit Hilfe der logistischen Regression untersucht. Dabei führen korrelierte Daten zu Verzerrungen bei der Parameterschätzung. Die daraus abgeleiteten Chancenverhältnisse spiegeln nicht die reale Risikostruktur wider. Es konnte gezeigt werden, dass bei entsprechender, möglichst fachlich motivierter Dekomposition und Reduktion der Variablen eine adäquate Risikoquantifizierung möglich ist.
Einen weiteren Schwerpunkt stellten Methoden zur Identifizierung räumlicher Häufungen von Erkrankungen auf der Basis des Konzepts der Autokorrelation dar. Diese sind ohne ergänzende problemspezifische Restriktionen nicht geeignet, epidemiologisch relevante Cluster richtig zu erkennen. Anhand ausgesuchter Datensätze konnten die Folgen inadäquater Anwendung der betrachteten Methoden anschaulich demonstriert werden.

Nutzung ungenauer Informationen und qualitativer Daten in der Risikobewertung
Fröhlich, A., Selhorst, T., Staubach, C., Vesely, J. und Ziller, M.*

In der Veterinärepidemiologie sind häufig die erforderlichen Informationen für eine klassische quantitative Risikoanalyse nicht oder nur sehr unpräzise vorhanden. Deshalb müssen alternative Methoden verwendet bzw. entwickelt werden, die zu klaren, reproduzierbaren und nachvollziehbaren qualitativen Risikobewertungen führen. Für die Risikomodellierung bedeutet dies das Einbeziehen von unvollständigen Informationen, qualitativen Daten (kategoriale Bewertungen) und unscharfen Zahlen, um Expertenmeinungen und andere unpräzise Informationen abbilden zu können.
In verschiedenen Beispielen konnte demonstriert werden, dass eine Transformation unscharfer Zahlen und qualitativer Daten in Wahrscheinlichkeitsdichten geeignet ist, sehr komplexe, gemischte Modelle in stochastische Modelle zu überführen. Weiterhin wurden Methoden zur Rekonstruktion empirischer Dichten aus zusammengefassten Verteilungs-Informationen untersucht. Mit entsprechenden Simulationstechniken kann dann das Ergebnis und seine Variabilität abgeschätzt werden. Damit ist es möglich, alle verfügbaren Informationen in ihrer vorliegenden Form in qualitative und quantitative Risikobewertungen einzubeziehen und zusätzliche, künstliche Annahmen sowie Informationsverluste zu vermeiden.

10 BEHÖRDLICHE AUFGABEN UND DIAGNOSTIK

10.1 ZULASSUNGEN UND CHARGENPRÜFUNGEN

10.1.1 Zulassungen und Prüfung von Impfstoffen und anderen Mitteln nach der Tierimpfstoffverordnung

Produkt	Menge	Zweck	Personen	Standort
polyklonales Serum (Tollwut)	1	Zulassung	T. Müller	Wusterhausen
ELISA Testkit (Aujeszkysche Krankheit)	2	Zulassung	T. Müller	Wusterhausen
ELISA Testkit (Aujeszkysche Krankheit)	3	Chargenprüfung	T. Müller	Wusterhausen
ELISA, BLV	5	Chargenprüfung	D. Beier	Wusterhausen
ELISA, BLV	1	Zulassung	D. Beier	Wusterhausen
CAEV/MVV	2	Zulassung	D. Beier	Wusterhausen
ELISA, Fasciola hepatica	1	Chargenprüfung	G. Schares	Wusterhausen
ELISA, Cryptosporidium parvum	1	Chargenprüfung	F.J. Conraths	Wusterhausen
SIV-Antikörper-ELISA	2	Zulassung	E. Lange	Insel Riems
Anti-CSFV-FITC-Konjugat	2	Chargenprüfung	J.P. Teifke	Insel Riems
Anti-CSFV-mAk	1	Chargenprüfung	J.P. Teifke	Insel Riems
Borreliose Hund ELISA	1	Zulassung	J. Süss C. Klaus	Jena
Borreliose Hund ELISA	5	Chargenprüfung	J. Süss C. Klaus	Jena
Borreliose Pferd ELISA	1	Zulassung	J. Süss C. Klaus	Jena
Borreliose Pferd ELISA	3	Chargenprüfung	J. Süss C. Klaus	Jena
Borreliose Hund Westernblot	1	Zulassung	J. Süss C. Klaus	Jena
Borreliose Hund Westernblot	2	Chargenprüfung	J. Süss C. Klaus	Jena
Flocktype recMs ELISA, (FLI-B 432), Labordiagnostik Leipzig	1	Zulassung und Chargenprüfung	E. Schubert	Jena
Salmonella ELISA	1	Zulassung	U. Methner	Jena
Salmonella ELISA	26	Chargenprüfung	U. Methner	Jena
Salmonella ELISA	1	Laborprüfung nach Änderungsanzeige	U. Methner	Jena
ELISA Testkit (APP-ApxIV)	5	Chargenprüfung	A. Raßbach	Jena
Ascoli-Test Positivserum für die Milzbranddiagnostik	1	Chargenprüfung	A. Raßbach	Jena
Ascoli-Test Antigen für Milzbranddiagnostik	1	Chargenprüfung	A. Raßbach	Jena
Malleus-KBR Positivserum	1	Chargenprüfung	M. Elschner	Jena
Malleus-KBR	1	Chargenprüfung	M. Elschner	Jena

Produkt	Menge	Zweck	Personen	Standort
Antigen				
BGVV-B 235 (PCR-Test Mycoplasma gallisepticum)	1	Chargenprüfung	H. Hotzel	Jena
Paratuberkulose-ELISA	7	Chargenprüfung	H. Köhler	Jena
Paratuberkulose-ELISA	1	Zulassung	H. Köhler	Jena
Taylorella equigenitalis-DNA-Amplification-Kit	1	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
ELISA Brucellose	4	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
KBR-Antigen Brucellose	1	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
RBT-Antigen Brucellose	1	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
Chekit Chlamydia ELISA, (BGVV-B 245) IDEXX	2	Chargenprüfung bzw. Chargenprüfung und Änderungsanzeige	E. Schubert	Jena
Flocktype recMs ELISA (FLI-B 432), Labordiagnostik Leipzig	1	Zulassung und Chargenprüfung	E. Schubert	Jena
MKS-ELISA	3	Zulassung	B. Haas	Insel Riems

siehe auch Angaben aus den einzelnen Referenzlaboratorien

10.2 DIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
87 Gehirne von Fledermäusen	Untersuchung auf TW-Antigen[A]	1 x positiv 86 x negativ	T. Müller
1 Gehirn vom Fuchs	Untersuchung auf TW-Antigen[A]	1 x negativ	T. Müller
2 Gehirne vom Hund	Untersuchung auf TW-Antigen[A]	2 x negativ	T. Müller
6 Gehirne von Hyänen	Untersuchung auf TW-Antigen[A]	6 x negativ	T. Müller
1 Gehirn vom Reh	Untersuchung auf TW-Antigen[A]	1 x negativ	T. Müller
1 Gehirn vom Hund	Untersuchung auf TW-Antigen[A]	1 x negativ	T. Müller
4 Gehirne vom Wolf	Untersuchung auf TW-Antigen[A]	4 x negativ	T. Müller
3 Gehirnsuspensionen von Fledermäusen	Untersuchung auf TW-Antigen[A]	3 x negativ	T. Müller
28 IgG Proben/ Plasmapools	Untersuchung auf TW-Antikörper[h]		T. Müller
44 Impfköder	Stabilitätstestung[h]		T. Müller
12 Hybridomaüberstände	Eignungsprüfung[h]		T. Müller
2 Seren vom Affen	Untersuchung auf TW-Antikörper[h]	2 x negativ	T. Müller
982 Seren vom Menschen	Untersuchung auf TW-Antikörper[h]	620 x positiv	T. Müller
14 Seren vom Hund	Untersuchung auf TW-Antikörper[h]	9 x positiv	T. Müller
6 Seren von Antilopen	Untersuchung auf TW-Antikörper[h]	6 x negativ	T. Müller

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
2 Seren vom Wolf	Untersuchung auf TW-Antikörper[h]	2 x negativ	T. Müller
7 Tollwutvirusisolate	Virustypisierung[h]	3 x Genotyp 1 4 x Genotyp 5	T. Müller
11 Seren von Hausschweinen	Untersuchung auf AK-Antikörper[h]	11 x negativ	T. Müller
196 Seren von Rindern (national)	Untersuchung auf BLV-Antikörper[h]	66 x positiv	D. Beier
30 Seren von Rindern (international)	Untersuchung auf BLV-Antikörper[A]	9 x positiv	D. Beier
23 Milchproben	Untersuchung auf BLV-Antikörper[h]	22 x positiv	D. Beier
2 Tumormaterialproben von Rindern	Untersuchung auf BLV-Provirus[h]	2 x negativ	D. Beier
183 PBMC aus EDTA-Blut	Untersuchung auf BLV-Provirus[h]	61 x positiv	D. Beier
8 Seren von Ziegen	Untersuchung auf CAEV-Antikörper[h]	5 x positiv	D. Beier
16 Seren von Schafen	Untersuchung auf MVV-Antikörper[h]	5 x positiv	D. Beier
4 Seren von Antilopen	Untersuchung auf BLV-Antikörper[I]	4 x negativ	D. Beier
4 Seren von Antilopen	Untersuchung auf BLV-Antikörper[E]	4 x negativ	D. Beier
3 Organproben (Trachea, Tonsille, Lunge) und 1 RNA-Extrakt	Nachweis SIV[hA]	3 x Organproben positiv RNA-Extrakt in PCR positiv	E. Lange E. Starick
2 Organproben, 1 Zellkulturüberstand, 2 x Eiflüssigkeit und 1 RNA-Extrakt vom Schwein	Nachweis SIV und Differenzierung[hA]	Eiflüssigkeit und Zellkulturüberstand positiv, Differenzierung SIV: H3N2	E. Lange E. Starick
2 Lunge, 1 RNA-Extrakt	Nachweis SIV[hA]	RNA-Extrakt PCR-positiv Zellkultur negativ	E. Starick E. Lange
199 Organproben und 242 Serum-Plasmaproben	Virus- bzw. Antikörpernachweis SIV[hA]	2 x positiv 11 x im HAHT positiv	E. Lange
10 Seren vom Wildschwein	Untersuchung auf Antikörper gegen Pestiviren [h A]	KSP: 6 x positiv BDV: 1 x positiv	V. Kaden
4 Isolate, Organanreibungen vom Wildschwein	KSPV-Typisierung[h]	3 x negativ 1 x positiv Genotyp: 1 x 2.3. Rostock Phänotyp: 1 x Flandern'90	V. Kaden, G. Strebelow
15 Organe vom Wildschwein	KSPV-Typisierung[hA]	Genotyp: 1 x 2.3. Rostock	G. Strebelow
11 Blutproben	Untersuchung auf KSPV[hA]	Negativ	V. Kaden
1 Knochen	Untersuchung auf KSPV[hA]	Negativ	V. Kaden
87 Organproben und Isolate (Zellkulturpassagen) von Regenbogenforellen	Virusisolierung und -identifizierung, RT-PCR und Genomanalyse[hA]	3x VHSV 13x IPNV 24 VHS-Genotypisierungen 35 IHN-Genotypisierungen 12x negativ	D. Fichtner, S. Bergmann, P.-J. Enzmann, H. Granzow

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
32 Blutproben von Forellen	Antikörper-Nachweis[h]	Antikörper gegen VHSV, IHNV und IPNV	S. Bergmann, D. Fichtner
39 Organproben, Isolate (Zellkulturpassagen), und Nukleinsäure-Präparationen von Nutzkarpfen	Virusisolierung und -identifizierung, PCR [h]	2x Picornavirus 9x KHV-Genom positiv 27x KHV-Genom negativ 1x virologisch negativ	S. Bergmann, D. Fichtner, H. Granzow
9 Organproben und Isolate von Aalen	Virusisolierung und -identifizierung, PCR[h]	3x Herpesvirus anguillae (HVA) 1x Rhabdovirus anguillae (RVA) 3x negativ	S. Bergmann, D. Fichtner, H. Granzow
2 Organproben vom Giebel	PCR[h]	KHV-Genom negativ	S. Bergmann, D. Fichtner
1 Organprobe vom Barsch	Virusisolierung[A]	Virologisch negativ	D. Fichtner
1 Organprobe vom Stör	Virusisolierung[A]	Virologisch negativ	S. Bergmann
4 Organproben von Bachsaiblingen	Virusisolierung und -identifizierung[h]	Negativ	S. Bergmann, D. Fichtner
1 Blutserum vom Bachsaibling	Antikörper-Nachweis[h]	IHNV-Antikörper	S. Bergmann, D. Fichtner
1 Zellkulturpassage von Schleien	Virusisolierung, und -identifizierung	Virologisch negativ	D. Fichtner, S. Bergmann
60 Passagen mit Bachforellen-Leberzellkulturen	Virusisolierung (Kokultivierung mit verschiedenen Fisch-Zelllinien)[hA]	Negativ	D. Fichtner, B. Köllner, S. Bergmann, H. Granzow
1 Karausche	Virusisolierung[h]	Virologisch negativ	D. Fichtner
20 Organproben von Goldfischen	Virusisolierung, PCR[hA]	4x KHV-Genom positiv 15x KHV-Genom negativ 1x virologisch negativ	S. Bergmann, D. Fichtner
50 Organproben von Koi-Karpfen	PCR[hA]	27x KHV-Genom positiv 23x KHV-Genom negativ	S. Bergmann, D. Fichtner
10 Zierfische (Platys)	PCR[hA]	LCDV-Genom negativ	S. Bergmann
609 Wildvögel unterschiedlicher Spezies	Untersuchung auf HPAI mittels Obduktion, Histopathologie, Immunhistologie[hA]		J.P. Teifke, R. Klopfleisch, T. Harder, A. Globig
2 Puten	Untersuchung auf HPAI mittels Obduktion, Histopathologie, Immunhistologie[hA]	2 x HPAIV H5N1	J.P. Teifke, R. Klopfleisch, T. Harder, A. Globig
Paraffinblöcke, 3 Katzen	Immunhistologie[hA]	3 x HPAIV H5N1	J.P. Teifke, R. Klopfleisch
Paraffinblöcke, 1 Steinmarder	Immunhistologie[hA]	3 x HPAIV H5N1	J.P. Teifke, R. Klopfleisch
15 Formalinfixierte Gewebsproben, Pferd	Histopathologie und Untersuchung auf BPV mittels PCR und ISH[A]	13 x Equine Sarkoide 2 x granulomatöse Dermatitis	J.P. Teifke, I. v. Felbert
Paraffinblöcke, Rind	Immunhistologie für CD3[h]	5 x negativ	J.P. Teifke, D. Beier
2 Rinder	Obduktion, Histopathologie[hA]	2 x Paratuberkulose	J.P. Teifke, R. Klopfleisch, U. Polster
6 Marderhunde	Obduktion, Histopathologie[A]	6 x Sarkoptesräude	J.P. Teifke, I. v. Felbert, U. Polster

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
1 Reh	Obduktion, Histopathologie[A]	Dassellarvenbefall	J.P. Teifke
Haut, Wildschwein	Histopathologie[A]	Sarkoptesräude	J.P. Teifke
Haut, Schaf	Histopathologie zum Ausschluss von Schafpocken[A]	proliferative Dermatitis unklarer Ätiologie	J.P. Teifke
Formalinfixierte Gewebe, 3 Enten	Histopathologie und Immunhistologie zum Ausschluss von HPAI[hA]	Hämochromatose der Leber	J.P. Teifke
Formalinfixierte Gewebe, 3 Schweine	Histopathologie, Verdacht auf EMC[Ah]	Unklar	J.P. Teifke
Formalinfixierte Gewebe, 1 Mufflon	Histopathologie, Immunhistologie, In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von BTV[Ah]	Unklar	J.P. Teifke
Paraffinblöcke, 2 Schweine	Histopathologie[A]	Teschovirusinfektion	J.P. Teifke, M. Dauber
Paraffinschnitte, Philby-Steinhühner	Histopathologie und Immunhistologie auf aviäre Influenza[A]	Negativ	J.P. Teifke
6 x Hautbiopsie Schaf	Untersuchung auf Parapoxvirus[A]	3 x positiv 3 x negativ	H. Voigt
2 x Hautbiopsie Alpaka	Untersuchung auf Parapoxvirus[A]	2 x negativ	H. Voigt
1 x Hautbiopsie Mensch	Untersuchung auf Parapoxvirus[A]	1 x positiv	H. Voigt
61 Zeckenproben (Pools)	Untersuchung auf FSMEV[A]	8 positiv, 53 negativ	J. Süss Ch. Klaus
1x Gehirn, Liquor vom Affen	Untersuchung auf FSMEV[h]	Gehirn positiv, Liquor negativ	J.Süss H.Hotzel Ch. Klaus E.Liebler-Tenorio
15 Seren vom Hund	Untersuchung auf Borrelien-AK[h] (ELISA, IgG)	12 positiv, 1 negativ, 2 fraglich	J. Süss Ch. Klaus
15 Seren vom Hund	Untersuchung auf Borrelien-AK[h] (ELISA, IgM)	5 positiv, 9 negativ, 1 fraglich	J. Süss Ch. Klaus
15 Seren vom Hund	Untersuchung auf Borrelien-AK[h] (Westernblot)	5 positiv, 10 negativ	J. Süss Ch. Klaus
20 Seren vom Pferd	Untersuchung auf Borrelien-AK[h], (ELISA, IgG)	18 negativ, 2 fraglich	J. Süss Ch. Klaus
1 Serum vom Pferd	Untersuchung auf FSMEV[A]	1 negativ	J. Süss Ch. Klaus
1 Serum vom Pferd	Untersuchung auf *A. phagozytophilum*[A]	1 negativ	J. Süss H. Hotzel
11 Liquores (human)	Untersuchung auf FSMEV[h]	3 positiv, 8 negativ	J. Süss Ch. Klaus
2 Milzproben von 2 Schafen	Kulturelle Untersuchung auf *Bacillus anthracis*[h]	2 x negativ	A. Raßbach
121 Seren von Pferden, Eseln	Export-, Abklärungs- bzw. Verdachtsuntersuchungen auf Antikörper gegen *Burkholderia mallei* mit KBR und ggf. Westernblot [h,A, E]	4 x positiv	M. Elschner
Serum vom Menschen	Untersuchung auf Antikörper gegen *Burkholderia mallei* [A]	1x negativ	M. Elschner
1 Isolat	Identifizeirung von B. cepacia mittels PCR und Sequenzierung	1x negativ	M. Elschner G. Schmoock, H. Hotzel

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
Augentupfer vom Pferd	Molekularbiologische Untersuchung auf *B. mallei*[h]	1x negativ	M. Elschner
Organproben von 1 Pferd	Pathologisch-anatomische, histologische, kulturelle und molekularbiologische Untersuchung auf *B. mallei*[h]	1x positiv	M. Elschner E. Liebler-Tenorio P. Wohlsein
Organproben von 5 Meerschweinchen	Pathologisch-anatomische, histologische, kulturelle und molekularbiologische Untersuchung auf *B. mallei*[h]	1x Positiv	M. Elschner E. Liebler-Tenorio P. Wohlsein
31 *Campylobacter*-(*C.*)-*fetus*-Isolate	Differenzierung[A]	21 x *C. fetus* subsp. *venerealis* 2 x *C. fetus* subsp. *fetus* 4 x *C. hyointestinalis* 1 x *C. sputorum*	H. Hotzel
244 Mykobakterien-Isolate	Differenzierung[A]	231 x *M. avium* ssp. *paratuberculosis* 3 x *M. terrae* 1 x *M. kansasii* 3 x nicht differenzierbar 1 x nicht auswertbar 5 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler P. Möbius H. Hotzel
13 Kotproben von Rindern	Untersuchung auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)[A]	2 x *M. avium* ssp. *paratuberculosis* 7 x negativ 4 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler
9 Darmschleimhaut-proben vom Rind	Untersuchung auf MAP[A]	6 x *M. avium* ssp. *paratuberculosis* 3 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler
16 Kot- und Organproben vom Schaf	Untersuchung auf MAP[A]	2 x *M. avium* ssp. *paratuberculosis* 14 x negativ	H. Köhler
8 Kot- und Organproben von Ziegen	Untersuchung auf MAP[A]	8 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler
5 Organproben von Wildwiederkäuern	Untersuchung auf MAP[A]	2 x *M. avium* ssp. *paratuberculosis* 3 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler
56 Kolostrumproben von Rindern	Untersuchung auf MAP[A]	2 x *M. avium* ssp. *paratuberculosis* 2 x atypische Mykobakterien 22 x negativ 31 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler P. Möbius H. Hotzel
3 Milchproben vom Rind	Untersuchung auf MAP[A]	1 x *M. avium* ssp. *paratuberculosis* 2 x negativ	H. Köhler
1 Serum eines Bullen	Untersuchung auf Antikörper gegen MAP[A]	1 x negativ	H. Köhler
Seren von Rindern	Abklärung nicht negativer Befunde[h] (Brucellose)	29 x negativ	F. Melzer
Seren von Schweinen	Abklärung nicht negativer Befunde[h] (Brucellose)	18 x negativ	F. Melzer
Seren von Schafen	Abklärung nicht negativer Befunde[h] (Brucellose)	31 x negativ	F. Melzer

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
Seren von Ziegen	Abklärung nicht negativer Befunde[h] (Brucellose)	12 x negativ	F. Melzer
Serum vom Wildschweinen	Abklärung nicht negativer Befunde[h] (Brucellose)	1 x positiv	F. Melzer
Seren von Antilopen	Untersuchung auf Brucellose[I]	4 x negativ	F. Melzer
Seren von Kamelen	Untersuchung auf Brucellose[A]	2 x negativ	F. Melzer
Seren vom Mensch	Untersuchung auf Brucellose[A]	7 x negativ 1 x positiv	F. Melzer
Seren von Schafen	Untersuchung auf *B.ovis* Antikörper[E]	99 x negativ	F. Melzer
Serum vom Hund	Untersuchung auf *B.canis* Antikörper[E]	1 x negativ	F. Melzer
Bakterienstämme vom Mensch	Untersuchung auf *Brucella* spp.[A]	17 x *B. melitensis* 5 x negativ	F. Melzer
Bakterienstamm vom Wildschwein u. Mischkreuzung	Untersuchung auf *Brucella* spp.[h]	6 x *Brucella suis 2*	F. Melzer
1 Verdachtsfall Serum, Pferd	Nachweis von Antikörpern gegen *F. tularensis*, SLA[h]	1 x negativ	P. Otto
1 Verdachtsfall Plattenkultur	Nachweis von *F. tularensis*, Feldhase, Kultur und PCR[h]	F. *tularensis holarctica* 06T0001	W. Müller P. Otto
7 Organproben, Feldhase	Nachweis von *F. tularensis*, PCR[h]	2 x *F. tularensis* holarctica 5 x negativ	W. Müller P. Otto
1 Kotprobe, Hund	Rotavirus-Nachweis, PAGE[A]	1 x negativ	P. Otto
4 Kotproben, Katze	Rotavirus-Nachweis, PAGE[A]	4 x negativ	P. Otto
5 Kotproben, Rind	Rotavirus-Nachweis, ELISA[A]	2 x positiv, 3 x negativ	P. Otto
3 Kotproben, Rind	Norovirus-Nachweis, RT- und nestedPCR[A]	3 x negativ	P. Otto
2 Kotproben, Kamel	Rotavirus-Nachweis, PAGE, Virusnachweis[A]	2 x negativ (PAGE) 2 x positiv (Virusnachweis)	P. Otto
201 x Darminhalt, Huhn	Rotavirus-Nachweis, PAGE oder qRT-PCR bzw. RT-PCR[A]	3 x Rotavirus Gruppe A 121xRotavirusGruppe D 1 x Rotavirus Gruppe F 5 x Reovirus 71 x negativ	P. Otto
21 x Darminhalt, Pute	Rotavirus-Nachweis, PAGE und RT-PCR[A]	15x Rotavirus Gruppe D 6 x negativ	P. Otto
16 Proben dsRNA	Reovirus-Nachweis, PAGE[A]	3 x Reovirus 13 x negativ	P. Otto
4 Proben dsRNA	Rotavirus-Nachweis, RT-PCR[A]	4 x negativ	P. Otto
6 Serumproben Kaninchen	Nachweis von Rotavirus-Antikörpern, SNT[A]	6 x positiv	P. Otto
19 humane Sputumproben	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray); Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	2x*C.pneumoniae* 1x *Cp. abortus*, 1x *Cp.psittaci*? 15 x negativ	K. Sachse
6 humane Organproben	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Ver-dacht Psittakose/Ornithose[h]	6 x negativ	K. Sachse

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
9 humane Organproben	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray)[A]	3 x positiv	K. Sachse
8 humane Tupferproben	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR) Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	8 x negativ	K. Sachse
2 humane Bronchiallavage	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Ver-dacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x *Cp. psittaci* 1x *C. trachomatis*	K. Sachse
1 humaner Rachenabstrich	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Ver-dacht Psittakose/Ornithose[h]	1x *Cp. psittaci*	K. Sachse
4 div. respir. Flüssigkeiten (human)	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Ver-dacht Psittakose/Ornithose[h]	4 x negativ	K. Sachse
1 humane Urinprobe	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Ver-dacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x negativ	K. Sachse
28 humane Nasenabstriche	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Ver-dacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x positiv *Cp. caviae*	K. Sachse
28 humane Rachenabstriche	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x positiv; *C. trachomatis*	K. Sachse
10 Kotproben von Papageien	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x positiv	K. Sachse
23 Kotproben von Sittichen	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	8 x positiv	K. Sachse
2 Tupferproben vom Sittich	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x positiv	K. Sachse
2 Organproben von Psittaciden	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x positiv	K. Sachse
10 Kotproben von Psittaciden	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	5 x positiv 1 x fragl. pos.	K. Sachse
24 Zellkulturüberstände von Psittaciden	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	9 x positiv 1 x Chlamydiaceae	K. Sachse
3 Tupferproben von Psittaciden	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x positiv	K. Sachse
3 DNA-Proben von Psittaciden	Nachweis Chlamydien (Mikroarray)[A]	1 x positiv *Cp. abortus*	K. Sachse
2 Organproben von Vögeln	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	2 x negativ	K. Sachse
9 Tupferproben von Vögeln	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	3 x positiv	K. Sachse
7 Kotproben von Vögeln	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	3 x positiv	K. Sachse
1 DNA-Probe vom Vogel	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x negativ	K. Sachse
1 DNA-Probe von Taube	Nachweis Chlamydien (Mikroarray) [A]	1 x negativ	K. Sachse

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
2 DNA-Proben von Puten	Nachweis Chlamydien (Mikroarray) [A]	2 x positiv, *Cp. abortus/psittaci*; *Cp. abortus*	K. Sachse
4 Kotproben von Enten	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	1 x positiv	K. Sachse
2 Kloakentupfer von Geflügel	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	2 x positiv *Cp. caviae*	K. Sachse
2 Sammelkotproben von Geflügel	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray), Verdacht Psittakose/Ornithose[h]	2 x negativ	K. Sachse
2 Organproben vom Schaf	Nachweis *Cp. abortus* (rtPCR, Mikroarray) [A]	2 x positiv	K. Sachse
3 Organproben von Ziegen	Nachweis *Cp. abortus* (rtPCR, Mikroarray) [A]	3 x positiv	K. Sachse
25 Nasentupfer vom Rind	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	1 x positiv	K. Sachse
8 Augentupferproben vom Rind	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	8 x negativ	K. Sachse
16 Tupferproben vom Rind	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	16 x negativ	K. Sachse
16 Milchproben vom Rind	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	16 x negativ	K. Sachse
11 Organproben vom Rind	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	6 x Chlamydiaceae, 1x *Cp.psittaci*	K. Sachse
4 Präputialspülungen vom Rind	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	4 x negativ	K. Sachse
7 DNA-Proben vom Rind	Nachweis Chlamydien (Mikroarray) [A]	4 x positiv, *Cp. abortus*; 1 x positiv *C. suis/pecorum*	K. Sachse
6 Spermaproben vom Eber	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	2 x positiv	K. Sachse
10 Kotproben vom Schwein	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	4 x positiv	K. Sachse
19 Tupferproben vom Schwein	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	13 x positiv, 1 x fraglich	K. Sachse
6 Organproben vom Schwein	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	6 x negativ	K. Sachse
1 Organprobe vom Schwein	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	1 x negativ	K. Sachse
2 Tupferproben vom Pferd	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	2 x positiv *Cp. caviae*	K. Sachse
4 Augentupfer vom Pferd	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	1 x positiv *Cp. caviae*	K. Sachse
6 Nasentupfer vom Pferd	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	6 x positiv *Cp. caviae*	K. Sachse
1 DNA-Probe vom Pferd	Nachweis Chlamydien (Mikroarray) [A]	1 x pos. C. suis	K. Sachse
2 Tupferproben von Katzen	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	2 x negativ	K. Sachse
2 DNA-Proben von Katzen	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	1 x *C. suis*+ *C. trachomatis*; 1 x *Cp. psittaci*	K. Sachse
4 Blutproben vom Hund	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	4 x negativ	L. Sprague
9 Rachentupfer vom Hund	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	3 x positiv	L. Sprague
6 Augentupferproben vom Hund	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	3 x positiv	L. Sprague

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
6 Nasentupferproben vom Hund	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	3 x positiv	L. Sprague
8 Organproben von Mäusen	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	8 x negativ	K. Sachse
8 Organproben von Ratten	Nachweis Chlamydien (rtPCR) [A]	8 x negativ	K. Sachse
1 Organprobe vom Frosch	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	1 x positiv; *Cp. abortus*	K. Sachse
4 Ringversuchsproben (DNA)	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	1 x positiv	K. Sachse
1 Spezialmedium	Nachweis Chlamydien (rtPCR, Mikroarray) [A]	1 x fragl. positiv, *Cp. psittaci*	K. Sachse
1 Zellkulturprobe	Nachweis *Cp. psittaci* (rtPCR, Mikroarray) [A]	1 x positiv, *Cp. psittaci*	K. Sachse
20 humane Sputumproben	Zellkulturnachweis Chlamydien[h]	2 x positiv; 2 x Anzucht	E. Schubert
15 Kotproben von Sittichen	Zellkulturnachweis Chlamydien[h]	2 x positiv; 1 x Anzucht	E. Schubert
10 Organproben vom Schaf	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	10 x negativ	E. Schubert
12 Kotproben vom Rind	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	12 x negativ	E. Schubert
12 Nasentupfer vom Rind	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	12 x negativ	E. Schubert
2 Blutproben vom Rind	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	2 x negativ	E. Schubert
1 Serum vom Rind	Untersuchung Antikörper [A]	Negativ	E. Schubert
2 Augentupfer von Katze	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	1 x positiv	E. Schubert
2 Nasentupfer von Katze	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	1 x positiv	E. Schubert
2 Rachentupfer von Katze	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	1 x positiv	E. Schubert
4 Augentupfer vom Pferd	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	4 x negativ	E. Schubert
6 Nasentupfer vom Pferd	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	6 x negativ	E. Schubert
8 Rachenabstriche vom Hund	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	8 x negativ	L. Sprague
6 Augenabstriche vom Hund	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	1 x positiv; 2 x negativ	L. Sprague
6 Nasenabstriche vom Hund	Zellkulturnachweis Chlamydien [A]	6 x negativ	L. Sprague
4x Sperma vom Rind	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht und Immunfluoreszenz)[A]	3 x *M. canadense* 1 x *M. californicum*	E. Schubert K. Sachse
17x Nasentupfer vom Rind	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht und Immunfluoreszenz) [A]	10 x *M. bovirhinis* 1 x *M. arginini* 2 x *M.alkalescens* 4 x negativ	E. Schubert K. Sachse
4x Augentupfer vom Rind	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht, Immunfluoresz.) [A]	1 x *M. bovirhinis* 3 x negativ	E. Schubert K. Sachse
20x Milch vom Rind	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht, Immunfluoresz.) [A]	7 x *M. bovis* 13 x negativ	E. Schubert K. Sachse
2x Rachentupfer vom Wildvogel	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht, Immunfluoresz.) [A]	1 x *M. gallinaceum* 1 x *M.synoviae*	E. Schubert K. Sachse

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
15x Lunge vom Wildvogel	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht und Immunfluoreszenz) [A]	2 x *M. gallinaceum* 6 x Mischkultur, *M. arginini, M. gallinaceum* 6 x negativ 1 x nicht differenzierbar	E. Schubert K. Sachse
4x Augentupfer vom Schwein	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht und Immunfluoreszenz) [A]	2 x *M. hyorhinis* 1 x *M. hyosynoviae* 1 x *A. laidlawii*	E. Schubert K. Sachse
1x BAL vom Schwein	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht, Immunfluoresz.) [A]	1 x *M. hyorhinis*	E. Schubert K. Sachse
1x Augentupfer vom Schaf	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht, Immunfluoresz.) [A]	1 x negativ	E. Schubert K. Sachse
1x Nasentupfer von Ziege	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht, Immunfluoresz.) [A]	1 x negativ	E. Schubert K. Sachse
2x BAL von Ziege	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht, Immunfluoresz.) [A]	2 x negativ	E. Schubert K. Sachse
1x Rachenspülwasser vom Menschen	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht, Immunfluoresz.) [A]	1 x negativ	E. Schubert K. Sachse
28x Zellkultur	Unters. auf Mykoplasmen (Anzucht und Immunfluoreszenz) [A]	21 x negativ 6 x *M.arginini* 1 x *Mycoplasma* spp.	E. Schubert K. Sachse
28x Zellkultur	Unters. auf Mykoplasmen (PCR) [A]	21 x negativ 7 x positiv	
45 Chlamydien-Zellkultur	Unters. auf Mykoplasmen (PCR) [A]	9 x positiv 36 x negativ	E. Schubert K. Sachse
15x Pflanzen-DNA	Unters. auf Mykoplasmen (PCR) [A]	15 x positiv	E. Schubert K. Sachse
Rind: 37 Proben von 23 Tieren	Untersuchung auf Tuberkulose[A]	M. bovis/caprae, 18x M. avium ssp. avium, 7x M avium ssp. hominissuis, 1x keine Mykobakterien nachgew., 12x	I. Moser, H. Hotzel
Hühner: 11 Proben von 7 Tieren	Untersuchung auf Geflügeltuberkulose[A]	M avium ssp. avium, 11x	I. Moser
Heimtiere/ Haustiere: 71 Proben von 29 Tieren	Untersuchung auf:		
8 Katzen	Tuberkulose[A]	M. bovis, 1x M. avium ssp. hominissuis M. farcinogenes, 3x keine Mykobakterien nachgew. 1x offen, 3x	I. Moser H. Hotzel P. Möbius
5 Hunde	Tuberkulose[A]	M. avium ssp. hominissuis keine Mykobakterien nachgew. offen, 3x	I. Moser
2 Pferde	Tuberkulose[A]	keine Mykobakterien nachgew., 2	I. Moser
1 Frettchen	Tuberkulose[A]	M. simiae, M. avium ssp. avium	I. Moser H. Hotzel
6 Kaninchen	Tuberkulose[A]	M. avium ssp. avium, 22x	I. Moser

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
3 Psittaziden	Geflügeltuberkulose[A]	M. avium ssp. hominissuis, 1x M. avium ssp. avium, 1x keine Mykobakterien nachgew., 1x	I. Moser
1 Ente	Geflügeltuberkulose[A]	M. avium ssp. avium	I. Moser
185 Seren von Pferden	Untersuchung auf Antikörper gegen EIAV[h]	15 x positiv	P. König
19 Organe/Gewebe von Pferden	Untersuchung auf EIAV[h]	7 x positiv	P. König
164 Seren vom Rind	Untersuchung auf BVDV-Antigen[h]	Negativ	H. Schirrmeier
35 Seren vom Rind, 8 Ohrstanzproben	Untersuchung auf BVDV-Antigen und Viruscharakterisierung[h]	39 x BVDV1, 2 x BDV	H. Schirrmeier G. Strebelow
2 Seren von Gnuziegen	Untersuchung auf OHV2-Antikörper[I]	Negativ	H. Schirrmeier
2 Blutproben vom Rind	Untersuchung auf BVDV-Antigen[h]	2 x positiv (BVDV1)	H. Schirrmeier G. Strebelow
2 Lebern vom Kaninchen	Untersuchung auf RHDV[A]	1 x positiv	H. Schirrmeier
8 Sperma- und 9 Blutproben von Besamungsbullen	Untersuchung auf BVDV-Ag/Genom/Antikörper[h])	AG/Genom-negativ, 6 Tiere Antikörper-positiv	H. Schirrmeier
Hautproben vom Schaf	Virusnachweis[h]	Negativ	H. Schirrmeier H. Granzow J. Teifke
2 Virusisolate vom Rind	Virusnachweis und Charakterisierung[h]	BVDV1	H. Schirrmeier G. Strebelow
Organmaterial von 2 Sauen	Untersuchung auf EMCV[A]) (PCR/Anzucht)[A]	negativ (2 Proben PCV2-positiv)	H. Schirrmeier, J. Teifke
138 Seren vom Rind	Untersuchung auf BSV-Antikörper[A]	19 x positiv	H. Schirrmeier
18 Gewebeproben vom Rind	Untersuchung auf BVDV [h]	1 x positiv	H. Schirrmeier
2 Nasentupfer und 1 Blutprobe vom Rind	Untersuchung auf BKF[A]	Positiv	H. Schirrmeier B. Hoffmann
68 Seren von Rind, Schaf und Ziege	Untersuchung auf Pestivirusantikörper[h]	verbreitet BDV-positiv, 2 x BVDV1	H. Schirrmeier G. Strebelow
222 Seren aus 27 Schafbeständen	Untersuchung auf Pestivirusgenom und -antikörper[h]	6,7 % positiv, Bestandsprävalenz 22 %; BDV und BVDV1	H. Schirrmeier
2 Serumproben vom Rind	BVD-Diagnostik[h]	1 x BVDV1 1 x Antikörperpositiv (BVDV1)	H. Schirrmeier
8 Seren vom Rind	Untersuchung auf BVDV-Antikörper[h]	Negativ	H. Schirrmeier
182 Serumproben von Rindern und Schafen	Untersuchung auf OHV2-Antikörper[A]	30,2 % pos Rinder 100 % pos. Schafe	H. Schirrmeier
26 Seren von Gemsen	Untersuchung auf Pestivirus und Pestivirusantikörper[A]	2 Zellkulturisolate (BDV4) V4 x Antikörperpositiv	H. Schirrmeier G. Strebelow
1 Virusisolat vom Bison	Charakterisierung[A]	BHV4	H. Schirrmeier H. Granzow
4 Blutproben von Antilopen	Untersuchung auf OHV2[I]	Negativ	H. Schirrmeier
2 x Organe, Blut und Tupfer vom Bison	Untersuchung auf OHV2[A]	2 x positiv (PCR)	H. Schirrmeier

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
Organe und Tierkörper (Kaninchen)	Ermittlung der Ursachen einer anormalen Mortalität[A]	nicht abgeschlossen	H. Schirrmeier H. Granzow U. Polster R. Klopfleisch
4 Serumproben	Nachweis von Teschovirus-Antikörpern	Antikörper gegen PTV-1,2,5,7,12 vorhanden	M. Dauber
3 Organ-, 1 Kotprobe	Virusnachweis	Isolierung von PTV-5 aus Kotprobe, übrige negativ	M. Dauber
272 Organe, Tupfer, Virusisolate vom Geflügel und von Ziervögeln	RRT-PCR, Virusisolierung, Sequenzierung, HAH[h]	4 x Non H5/H7 AIV (2 x H4, H6, H11), 2 x H5 LPAIV, 1 x H5N1 HPAIV	O. Werner A. Globig B. Hoffmann E. Starick T. Harder
2428 Organe, Tupfer, Virusisolate von Wildvögeln	RRT-PCR, Virusisolierung, Sequenzierung, HAH[A]	651 x AIV positiv (M-Gen), davon 341 x H5N1 HPAIV; 48 LPAIV Isolate, davon 11 x H5, 6 x H7	O. Werner A. Globig B. Hoffmann E. Starick T. Harder
28 Seren von Puten	AIV-spezifische Antikörper[A,h]	Seronegativ	O. Werner A. Globig T. Harder
61 Seren von Hühnern	AIV-spezifische Antikörper[A,h]	Seronegativ, 2 x non H5/H7	O. Werner A. Globig T. Harder
183 Seren von Enten	H5-, H7-spezifische Antikörper[A,h]	4 x non H5/H7	O. Werner A. Globig T. Harder
195 Seren von Gänsen	H5-, H7-spezifische Antikörper[A,h]	6 x H5 seropositiv (ohne aktive H5 Infektion des Bestandes)	O. Werner A. Globig T. Harder
365 Seren und andere von Zoovögeln, 39 von Wachteln, 159 von Katzen, 17 von Hunden	H5-, H7-spezifische Antikörper[A,h]	113 x Zoovögel H5 seropositiv (zumeist Impftiter); 2 x Katzen H5 seropositiv	O. Werner A. Globig, T. Harder
2 Verdachtsfälle [h]	Maul- und Klauenseuche (MKS)	Negativ	B. Haas
2 Seren vom Menschen	MKS-Antikörper	Negativ	B. Haas
45 Seren von Wiederkäuern und Schweinen[E]	MKS-Antikörper	Negativ	B. Haas
2 Samenproben vom Bullen[E]	MKS-Virus	Negativ	B. Haas
2 Verdachtsfälle[h]	Vesikuläre Schweinekrankheit (SVD)	Negativ	B. Haas
51 Seren vom Schwein[E]	SVD-Antikörper	Negativ	B. Haas
336 Seren, i.d.R. vom Pferd [E, I]	Vesikuläre Stomatitis	Negativ	B. Haas
11 Seren vom Schwein[E]	Afrikanische Schweinepest	Negativ	B. Haas
1 Serum vom Schaf[h]	Schafpocken	Negativ	B. Haas B. Hoffmann
3652 EDTA-Blutproben von Rindern	BTV-Genom und -Antikörper[h]	3 x positiv 3649 x negativ	B. Hoffmann
2850 Proben von Rindern und Schafen (EDTA-Blut, Milz)	BTV-Genom und -Antikörper[h]	1730 x positiv 1120 x negativ	B. Hoffmann

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
414 Milchproben vom Rind	Untersuchung auf Antikörper gegen BTV[h]	141 x positiv 273 x negativ	B. Hoffmann
244 Gnitzenpools	Untersuchung auf BTV-Genomh	38 x positiv 206 x negativ	B. Hoffmann
276 Proben von Wildwiederkäuern (EDTA-Blut, Milz)	BTV-Genom und -Antikörper[A]	8 x positiv 268 x negativ	B. Hoffmann
26 Serumproben vom Pferd	Untersuchung auf Antikörper gegen AHSV[h]	26 x negativ	B. Hoffmann
2 RNA	RT-PCR-Sequenzierung [A]	2 x positiv BDV	G. Strebelow
35 Seren	RT-PCR-Sequenzierung [A]	35 x positiv 35 x BVD I	G. Strebelow
8 Ohrstanzen	RT-PCR-Sequenzierung [A]	8 x positiv 7 x BVD I ; 1x BDV	G. Strebelow
2 ZKÜ	RT-PCR-Sequenzierung [h]	2 x positiv 2 x BVD I	G. Strebelow
1 Organanreibung	RT-PCR-Sequenzierung [h]	Positiv KSPV 2.3 Rostock	G. Strebelow
3 Organanreibungen	RT-PCR [h]	3 x negativ	G. Strebelow
6 Organe (Milz)	RT-PCR-Sequenzierung [h]	6 x positiv KSPV 2.3 Güstrow	G. Strebelow
4 Blutproben	RT-PCR-Sequenzierung [h]	3 x positiv; 1x negativ 3 x KSPV 2.3 Güstrow	G. Strebelow
4 Blutproben	RT-PCR-Sequenzierung [h]	2 x positiv; 2x negativ 2 x KSPV 2.3 Güstrow	G. Strebelow
1 Blutprobe	RT-PCRh	Negativ	G. Strebelow
2 Organe	RT-PCR-Sequenzierung [h]	2 x positiv KSPV 2.3 Güstrow	G. Strebelow
2 Organe	RT-PCR-Sequenzierung [h]	2 x positiv KSPV 2.3 Güstrow	G. Strebelow
2 Blutproben 1 Serum	RT-PCR-Sequenzierung [h]	2 x Blut negativ Serum positiv KSPV 2.3 Güstrow	G. Strebelow
2 Organanreibungen	RT-PCR-Sequenzierung[A]	2 x positiv KSPV kozlov	G. Strebelow
1 Blutprobe	RT-PCR-Sequenzierung[h]	positiv BVD I	G. Strebelow
2 Seren	RT-PCR-Sequenzierung[A]	2 x positiv 2 x BDV	G. Strebelow
2 ZKÜ	RT-PCR-Sequenzierung[A]	2 x positiv 2 x BDV	G. Strebelow
6 Organe	RT-PCR[A]	6 x positiv	G. Strebelow
14 Organe	RT-PCR- Sequenzierung[h]	14 x positiv KSPV 2.3 Rostock	G. Strebelow
5 BHV-1-Isolate	Charakterisierung[h]		M. Beer
Serum/Plasma 1 x vom Hirsch 2 x vom Yak 8 x von Addaxantilopen 35 x vom Wasserbüffel 56 x vom Bison 773 x vom Rind	BHV-1-Diagnostik[h]		M. Beer
814 Seren/Plasma vom Rind	BHV-1-gE-Diagnostik[h]		M. Beer
9 Nasentupfer vom Rind	Verdacht auf BHV-1[h]		M. Beer
3 Milchproben vom Rind	BHV-1-Antikörper[A]		M. Beer
3 Organe und Organpoole	BHV-1[h]		M. Beer

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
2 Impfstoffe	Untersuchung auf BHV-1 und BHV-1-Genom[A]	alle Proben negativ	M. Beer
4 Zellkulturüberstände	Untersuchung auf Bovine Herpesviren[h]		M. Beer

[h] hoheitlich
[A] Amtshilfe
[I] Import
[E] Export

10.3 AUFGABEN IM RAHMEN DES GENTECHNIKRECHTS

Das FLI 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.

10.4 STELLUNGNAHMEN UND BERICHTE

Im Rahmen der Ressortberatung wurden vom FLI im Jahr 2006 ca. 150 Stellungnahmen für Bundes- und Landesministerien und -behörden sowie EU-Institutionen erarbeitet. Darüber hinaus wirkte das FLI an der Erarbeitung zahlreicher wissenschaftlicher Berichte der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) mit.

10.5 ABGABE VON DIAGNOSTIKA

Virusstämme
Aal-Herpesvirus (HVA)
Aal-Rhabdovirus (ARV 19)
Bovines Coronavirus (BCoV)
Border-Disease-Virus (BDV-1, BDV-2)
Bovines Enterovirus 1 (BEV-1)
Bovines Herpesvirus 1 (BoHV-1)
Bovines Parvovirus (BPV)
Bovines Respiratorisches Synzytialvirus (BRSV)
Bovines Rotavirus Gruppe A (BoR VgpA), Genotyp G[6] P[11] 4630F6
Equines Arteritisvirus (EAV-Buc)
Equides Herpesvirus 4 (EHV-4)
Felines Panleukopenie-Virus (CPV, FPV)
Herpesvirus anguillae (HVA)
Koi-Herpesvirus (KHV 200)
Koi-Herpesvirus (KHV), Stamm KHV-1 (Israel)
Myxomavirus (MYXV)
Porcines Adenovirus A (PAdV-A, PAdV-B)
Porcines Enterovirus 9 (PEV-9)
Porcines Parvovirus (PPV)
Porcines Rotavirus Gruppe A (PoRVgpA) 04V0051A5
Porcines Teschovirus 1 (PTV-1)
PRRS-Virus (PRRSV-L, PRRSV-VR)
Rhabdovirus anguillae (RVA), Isolat 59/96-121-
Rotavirus A (RV-A)
Säuger-Orthoreovirus (MRV)
Virus der Bovinen Virusdiarrhöe (BVDV-1, BVDV-2)
Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV)
Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV), Stamm RC 56/70

Virus der Hämatopoetischen Nekrose (IHNV) der Lachse
Virus der Infektiösen Hämatopoetischen Nekrose (IHNV), Isolat 233
Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV)
Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV), Serotyp Spjarup
Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV), Isolat MV 140/Riems
Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV), Stamm „Alfort 187“
Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV), Stamm „Koslov“
Virus der porzinen epidemischen Diarrhoe (PEDV)
Virus der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV)
Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV), Stamm Fi13 (VHS)
Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Karpfen (VHSV)

Bakterienstämme/-isolate
Bacillus anthracis-Stämme
Pasteurella multocida
Mykobakterienstämme
B. suis Biovar 2
F. tularensis holarctica 06T0001
F. tularensis holarctica 03-1292
Chlamydia muridarum DC39
Chlamydophila psittaci DC5, DC15
Cytophaga ssp., Lyophilisat
Flexibacter columnaris, Lyophilisat
Yersinia ruckeri, Lyophilisat

Mykoplasmenstämme:
Mycoplasma capricolum subsp. *capricolum*

DNA von:
Burkholderia mallei
Burkholderia pseudomallei
Chlamydophila psittaci
Chlamydia suis
Chlamydophila abortus
Chlamydophila pecorum
Chlamydophila pneumoniae
Campylobacter. fetus subsp. *venerealis*
Campylobacter fetus subsp. *fetus*
Campylobacter upsaliensis
Campylobacter lari
Campylobacter hyointestinalis
Campylobacter coli
Campylobacter jejuni

Antiseren
Anti-HVA Serum T37
Anti-IPNV-Serum
Anti-IPNV-Serum FK2325
Anti-KHV-Serum T36
Anti-KSP-Seren
BLV-Referenzserum, positiv für AGIDT und ELISA
BLV-Referenzserum, schwach positiv für ELISA
BLV-Referenzserum, negativ für AGIDT und ELISA
BLV-Referenzseren, falsch positiv für ELISA
BLV-Referenzmilch, positiv für ELISA
BLV-Referenzmilch, negativ für ELISA
BLV-Referenzmilch, falsch positiv für ELISA

CAEV-Referenzseren, positiv für ELISA
CAEV-Referenzseren, negativ für ELISA
positives Referenzserum für Lungenseuche-KBR
negatives Referenzserum für Lungenseuche-KBR
Seren im Rahmen des Ringversuches
Brucellose-Referenzserum, positiv
Brucellose-Referenzserum, negativ
Beschälseuche-Referenzserum, positiv
Beschälseuche-Referenzserum, negativ
Milchprobenpanel zur Evaluierung serologischer Methoden für die Paratuberkulose

Antigene
Antigen für Lungenseuche-KBR
Brucella ovis-Antigen
Tularämie-Antigen (*F. tularensis holarctica*)
Beschälseuche-Antigen

Nukleinsäurepräparationen
Aal-Herpesvirus-DNA
AIV RNA H5N1/Asia
AIV RNA H5 Stämme
AIV RNA H7 Stämme
AIV-M-Standard-RNA
BVDV-Standard-RNA
CSFV-Standard-RNA
pCV-2-Standard-DNA
Interne Kontroll-RNA/DNA
cDNA-Klon des White-Bream Virus (WBV-DF2400)
Herpesvirus anguillae-DNA
ISA-Virus (Referenzstamm Glesvaer 2/90)-RNA
Koi-Herpesvirus-DNA
RNA des Virus der Infektiösen Anämie der Lachse (ISA)
DNA von *F. tularensis holarctica*
dsRNA von Rotavirus-Isolaten

Monoklonale Antikörper
Anti-ILT-Virus-mAK 25-5 (gJ)
Anti-Influenza-mAK NP-Hybridomüberstand (HB65)
Anti-ISAV-mAK
Anti-ISAV-mAK 06D24
Anti-KHV (22 verschiedene)
Anti-KSP-mAKs

Aceton-fixierte Kryoschnitte:
Tonsillen, KSPV infiziert

10.6 REFERENZLABORATORIEN

Die Nationalen Referenzlaboratorien am FLI wurden von der AKS Hannover nach ISO/IEC 17025:2005 akkreditiert.

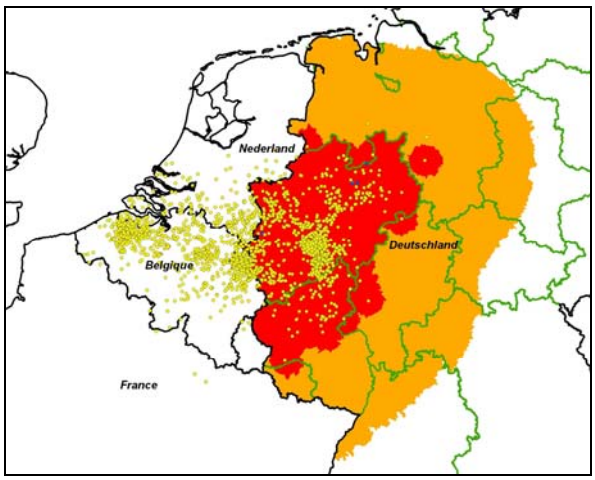
Nationales Referenzlabor für Ansteckende Schweinelähmung (Teschovirus-Enzephalomyelitis)
(M. Dauber)

Bei der Ansteckenden Schweinelähmung (Teschener Krankheit, Teschen-Talfan-Krankheit) handelt es sich um eine Erkrankung der Haus- und Wildschweine, die durch bestimmte Virusstämme aus der Familie *Picornaviridae*, Genus *Teschovirus*, verursacht werden kann. Sie wurde in Deutschland letztmalig 1957 diagnostiziert. Die Abgrenzung dieser in Deutschland anzeigepflichtigen schweren Form der Teschovirus-

Enzephalomyelitis von milderen Verlaufsformen ist im Einzelfall problematisch. Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles von Ansteckender Schweinelähmung sind: a) gehäuft auftretende klinische Erkrankungen (subakute Verlaufsformen ausgenommen), b) die histologische Untersuchung bestätigt das Vorliegen einer nichteitrigen Polioenzephalomyelitis, c) differentialdiagnostisch ist Schweinepest ausgeschlossen und d) Teschovirus (in der Regel vom Serotyp 1) wurde isoliert und identifiziert. Auf Grund der notwendigen komplexen Betrachtungsweise ist das Referenzlabor für Ansteckende Schweinelähmung nicht in der Lage, eine abschließende Diagnose zu stellen, sondern seine Leistungen müssen sich im Wesentlichen beschränken auf die Verifizierung des Virusnachweises. Soweit möglich erfolgt eine Serotypisierung. Monoklonale Antikörper (mAks) zum *In-vitro*-Nachweis von porzinen Teschoviren (PTV) mittels indirekter Immunfluoreszenz stehen zur Verfügung und werden im Bedarfsfall an Untersuchungseinrichtungen abgegeben. Ebenfalls kommerziell nicht erhältliche monoklonale Anti-PEV-A- und -B-mAks sind vorrätig.
2006 gelangten zwei Einsendungen von Seren bzw. Organ- und Kotproben zur Untersuchung. Die Seren aus einem Schweinebestand mit typischen Lähmungserscheinungen und Rückenmarksentzündungen besaßen Antikörper, die auf das gleichzeitige Vorkommen von zumindest fünf verschieden Serotypen des Teschovirus (1, 2, 5, 7, 12) hindeuteten. Im zweiten Fall (eingesandt aus Porto Alegre, Brasilien) wurde aus einer Kotprobe ein PTV-5 isoliert. Dort starben in einem Zuchtsauen-Bestand innerhalb von vier Tagen 70 Absatzferkel mit deutlicher Poliomyelitis.

Nationales Referenzlabor für Blauzungenkrankheit
(B. Hoffmann)

Im August 2006 wurde erstmals in Deutschland die Blauzungenkrankheit festgestellt. Seitdem kam es zur stetigen Ausbreitung der Erkrankung, so dass bis Ende 2006 insgesamt 885 amtlich bestätigte BTV-Ausbrüche in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Niedersachsen und Hessen festzustellen waren und große Teile des Bundesgebietes zu Schutz- und Restriktionszonen erklärt wurden.



BTV-Fälle in Deutschland 2006:

Schutzzone-rot
Restriktionszone-gelb
Bestätigte Fälle - gelbe Punkte
Verdachtsfälle – blaue Punkte

Quelle: FLI Wusterhausen

Die Ausbreitung der Blauzungenkrankheit und die damit einhergehende große Anzahl zu untersuchender Proben machte es erforderlich, in kürzester Zeit die labordiagnostischen Methoden an die regionalen Untersuchungsämter zu transferieren. Aufgrund der ausgesprochen langen Nachweisbarkeit von BTV-Genomen im Vollblut kann neben dem Antikörpernachweis mittels kommerziellem ELISA auch der Genomnachweis als geeignetes Verfahren zur Diagnostik von BTV herangezogen werden. Die Eignung der kommerziell zur Verfügung stehenden ELISA und einer am FLI entwickelten BTV 8 RT *real-time* PCR wurden mit Feldproben und Referenzmaterial überprüft.
Das NRL nahm 2006 erfolgreich an zwei BTV-Ringtests teil, die vom Europäischen Referenzlabor in Pirbright organisiert worden waren. Damit wurde die Eignung der am NRL etablierten Methoden für den

BTV-8-Nachweis bestätigt. Nach dem Transfer von Referenzmaterialien und der BTV8 RT *real-time* PCR-Methode an die regionalen Untersuchungsämter wurde im November 2006 ein nationaler Ringtest durchgeführt. Die 22 am Ringtest beteiligten Laboratorien zeigten dabei im Allgemeinen eine sehr gute diagnostische Qualität.
Neben der Etablierung, Validierung und Entwicklung der diagnostischen Verfahren zum Nachweis von BTV-Genomen und -Antikörpern hat das NRL-BT im Jahre 2006 mehr als 7.000 Proben im Rahmen der Wahrnehmung hoheitlicher Aufgaben und der Amtshilfe auf das Vorkommen von BTV-Antikörpern und BTV-Genom untersucht. Bei der Mehrzahl der Proben handelte es sich um EDTA-Blutproben von Rindern und Schafen. Weiterhin wurden Blut- und Organproben von Wildwiederkäuern, Milchproben von Rindern und Pools von Gnitzen aus Nordrhein-Westfalen (gesammelt und typisiert von Prof. Dr. Mehlhorn, Universität Düsseldorf) auf BTV untersucht. Von 244 Pools der Gattung *Culicoides* waren 38 Pools positiv. Hierbei handelte es sich immer um Pools, die durch *C. obsoletus* gebildet wurden. Bei der Untersuchung von mehr als 300 Proben von Wildwiederkäuern konnte zudem in acht Fällen ein positiver BTV-Nachweis erzielt werden.

Nationales Referenzlabor für Aujeszkysche Krankheit
(T. Müller)

Die Aufgaben des Nationalen Referenzlabors für Aujeszkysche Krankheit (AK) umfassen drei wesentliche Schwerpunkte: (i) die Labordiagnostik (Bestätigung von Diagnosen sowie Abklärung von AK-Verdachtsfällen, Sammlung, Erhaltung und Charakterisierung von PrV-Virusstämmen), (ii) die Standardisierung der Diagnostik (Vergleich von Testverfahren und Testreagenzien, Abgabe von Referenzseren, -virusstämmen, Aktualisierung von diagnostischen Methoden, Durchführung von Ringversuchen) sowie (iii) hoheitliche Aufgaben (Erarbeitung von Grundlagen für Leitungsentscheidungen, Stellungnahmen zu Entwürfen, Änderungen oder Neufassungen von nationalen, WHO- bzw. OIE- Richtlinien).

Nationales Referenzlabor für Beschälseuche
(I. Moser, K. Henning)

Die Beschälseuche ist eine durch *Trypanosoma equiperdum* hervorgerufene Deckinfektion der 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; von der OIE empfohlene Methode) auf spezifische Serumantikörper untersucht, da ein Erregernachweis selten Erfolg hat. Das Referenzlabor unterstützt die Veterinäruntersuchungsämter bei der Abklärung von positiven oder fraglichen Fällen. Außerdem stellt es für die Untersuchungsämter die für die KBR benötigten Reagenzien (Kontrollseren, Antigen) zur Verfügung. Das Antigen wird als Lyophilisat eines Referenzstammes im Referenzlabor hergestellt. Im Jahre 2006 wurde bei zwei aus der Mongolei importierten klinisch gesunden Pferden ein mittlerer bzw. hoher Antikörpertiter (KBR; 1:40 bzw. 1:640) gefunden, was den Verdacht auf das Vorliegen einer Beschälseuche-Infektion bedeutet. Die Diagnose wurde durch wiederholte KBR-Untersuchungen gestellt und durch Anwendung weiterer Methoden (Western Blot, ELISA) untermauert. Vergleichsuntersuchungen (KBR), die im OIE-Referenzlabor in Moskau durchgeführt wurden, erbrachten jedoch wiederholt negative Ergebnisse für die beiden Pferde. Dies verdeutlicht den großen Bedarf an Standardisierung und Spezifizierung der KBR und Einführung und Empfehlung neuer Methoden zur Beschälseuche-Diagnostik durch die OIE.

OIE- und Nationales Referenzlabor für Bovine Herpesviren vom Typ 1 (BHV-1)
(M. Beer)

Die BHV-1-Bekämpfung in Deutschland macht weitere Fortschritte, wobei nach wie vor jährlich mehr als drei Millionen Proben auf BHV-1 oder BHV-1-gE-Antikörper untersucht werden. Dem OIE- und Nationalen Referenzlabor für BHV-1 sind daher wie auch in den vergangenen Jahren eine große Zahl von Proben zur endgültigen Abklärung zugeführt worden. Hierbei waren auch Proben aus dem Ausland zu untersuchen.
Im Jahr 2006 wurden 875 Serum-, Plasma- und Milchproben aus 110 Einsendungen aufgrund unklarer Befunde oder zu Forschungszwecken von amtlichen Untersuchungseinrichtungen an das NRL weitergeleitet und auf BHV-1-Antikörper untersucht. Einen Schwerpunkt bildete dabei wiederum der Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern sowie die Bestätigung serologischer Befunde bei ungeimpften Tieren mit Hilfe von BHV-1-Antikörper-ELISAs (gB-*blocking*-ELISA und indirekte Vollvirus-ELISAs)

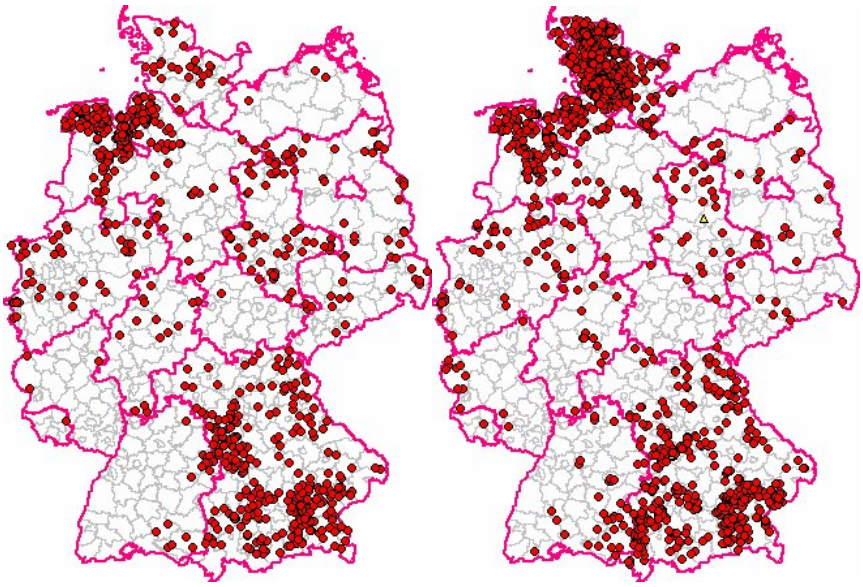
und dem Neutralisationstest. In der Regel wurden die Proben in mehreren Testsystemen parallel untersucht. In zwölf Fällen wurde versucht, BHV-1 aus Tupfer-, Blut-, Organ- oder Spermaproben zu isolieren sowie mit Hilfe einer BHV-1-gE- bzw. gB-spezifischen PCR BHV-1-Genom nachzuweisen. Für die BHV-1-Schnelldiagnostik wurde die neu entwickelte *real-time* PCR, die eine direkte Differenzierung von Wildtypviren und gE-deletierten Impfstämmen erlaubt, vollständig validiert und routinemäßig eingesetzt. In neun Fällen wurde zudem eine Charakterisierung von Virusisolaten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, der PCR, des Restriktionsenzymfragment-Längenpolymorphismus oder der Sequenzierung von Genomabschnitten durchgeführt.
Die Untersuchung von Seren so genannter „Pseudoimpflinge" (BHV-1-Antikörper-positiv und BHV-1-gE-Antikörper-negativ, jedoch keine Markerimpfung) mit Hilfe eines neu entwickelten gE-blocking ELISAs auf Basis der monoklonalen Antikörper 4D7 bzw. 5F5 zeigte, dass auch im Jahr 2006 keine auffälligen Reaktivitäten nachgewiesen werden konnten, die beispielsweise auf das Auftreten von gE-Mutanten hinweisen, die in der Lage sind, sich den kommerziellen Testsystemen zu entziehen. Mittlerweile wurde ein erster kommerzieller Prototyp des 4D7-ELISAs erfolgreich getestet und eingesetzt. Zukünftig könnte somit wieder ein alternativer gE-blocking-ELISA in Deutschland ergänzend zur Verfügung stehen.
Die fünf offiziellen deutschen Referenzseren (positives R1, schwach positives R2 und sehr schwach positives Serum R3 sowie die zwei negativen Seren R31 und R32) wurden an zahlreiche Untersuchungsstellen, auch im europäischen Ausland, abgegeben. Zudem wurden positive bzw. schwach positive Referenzmilchen (R26, R27, R28, R29) an Untersuchungsstellen und Diagnostikahersteller verschickt. Neben diesen Referenzmaterialien wurden BHV-1-Standardstämme zur Verwendung im Neutralisationstest oder der PCR zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 278 Referenzseren und 91 Referenzmilchen abgegeben.
Im Rahmen der Zulassung und Chargenfreigabe von *In-vitro*-Diagnostika wurden zudem insgesamt 29 verschiedene Testchargen (gE-blocking-ELSIAs, gB-blocking-ELISAs, indirekte ELISAs) geprüft. In zwei Fällen wurde die Chargen-Freigabe für einen BHV-1-ELISA nicht empfohlen, in zwei weiteren Fällen wurden Auflagen erarbeitet.

OIE- und nationales Referenzlabor für Enzootische Rinderleukose (ERL)
(D. Beier)

Die Biologische Standardkommission des OIE prüfte das Validierungs-Dossier des OIE- und nationalen Referenzlabors für Enzootische Rinderleukose zur Herstellung und Einsetzbarkeit des neuen BLV Antikörper-haltigen Standardserums E 05 als internationales Referenzserum und empfahl die Ablösung des bisherigen Standardserums E4. In Ergänzung des Prüfprotokolls wurde dem OIE eine Anwendervorschrift zur Veröffentlichung auf der OIE website zugeleitet.
Die Entwicklung einer *real-time* PCR zum direkten Erregernachweis ist abgeschlossen. Vergleichsweise wurde eine reverse Transkription (RT)-PCR zum direkten BLV-Nachweis etabliert und beide Methoden hinsichtlich ihrer analytischen Sensitivität verglichen. Ziel war die sichere Identifikation schwach infizierter Virusträger sowie eine mögliche Favorisierung einer PCR-Methode für den Routineeinsatz in den Untersuchungseinrichtungen. Beide Methoden weisen Vor- und Nachteile auf, die den Zeitfaktor, die Kontaminationsgefahr sowie ökonomische Gesichtspunkte betreffen. Die ersten Untersuchungsergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass durch die Untersuchung des Zellpellets nach kurzzeitiger Kultivierung der Lymphozyten in vitro auch sehr schwach infizierte Problemtiere, die sich dem BLV-Antikörpernachweis entziehen und/oder klinisch als ERL-Tumorverdacht auftreten, noch als BLV-Träger identifiziert oder ausgeschlossen werden können. Hierbei haben sich sowohl die env-nested-PCR durch den Nachweis von Provirus-DNA als auch die RT-PCR durch den Nachweis von Virus-RNA als sehr sensitiv erwiesen. Beide methodischen Möglichkeiten sind als Beitrag des gebündelten Einsatzes moderner Untersuchungsverfahren zu werten, die, unter Berücksichtigung der zeitgleich herrschenden epidemiologischen Situation, beim Auftreten oder dem Verdacht der ERL-Infektion einen wichtigen methodischen Beitrag im diagnostischen Spektrum leisten können.
Das OIE-Referenzlabor kam seinen Verpflichtungen hinsichtlich der Abgabe von Referenzmaterial, sowie bei fachlichen Anfragen als autorisiertes Expertengremium gegenüber internationalen Labors in Japan, China, Frankreich, Schweiz, UK, Polen, Österreich, Ukraine, Argentinien und Schweden nach.
Zu den hoheitlichen und amtlichen Aufgaben als nationales Referenzlabor gehörten im Berichtszeitraum die Zulassungs- und Chargen-Prüfungen von vier kommerziellen Testkits sowie die Abklärung von 221 unklaren Untersuchungsergebnissen, vorwiegend mittels PCR, aus den Untersuchungsämtern der Länder.

Nationales Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhöe/Mucosal Disease
(H. Schirrmeier)

Die Bovine Virusdiarrhöe/Mucosal Disease (BVD/MD) ist seit November 2004 anzeigepflichtig. Die sich seit dieser Zeit in Diskussion befindliche Bundesverordnung, auf deren Grundlage eine einheitliche verpflichtende Bekämpfungsstrategie für Deutschland erreicht werden soll, ist nach wie vor nicht in Kraft. Im TSN sind für das Jahr 2006 1.492 Fälle von BVD/MD ausgewiesen, das sind 574 mehr als 2005. Wesentliche, wenn nicht einzige Ursache für den Anstieg ist, dass nach Einführung eines sich an dem aktuellen Entwurf der Bundesverordnung anlehnenden Landesprogramms in Schleswig-Holstein der Pflicht zur Anzeige in diesem Bundesland vorbildlich entsprochen wird. Insgesamt zeigen die Zahlen jedoch, dass die Anzeigepflicht unzureichend durchgesetzt ist. Bei einer angenommenen Prävalenz von PI-Tieren von zwischen 0,1 – 0,5 % in der Nutzrinderpopulation ist mit einer etwa 10 – 50mal höheren Zahl tatsächlicher Fälle zu rechnen.



	2005	2006
SH:	51	612
NI.:	250	225
NW:	51	46
HE:	16	16
RP:	5	16
BW:	21	38
BY:	439	467
SL:	1	1
BB:	47	25
MV:	5	4
SN:	14	9
ST:	57	30
TH:	6	3

BVD-Fälle 2005 (links) und 2006 (rechts) in Deutschland, Angabe TSN

Im Rahmen der Wahrnehmung hoheitlicher Aufgaben und der diagnostischen Amtshilfe zur Abklärung von Verdachtsfällen wurden 288 Serum- bzw. Plasmaproben auf BVDV und/oder BVDV-Antikörper untersucht, achtmal gelangten Spermaproben und 26mal Organproben zur Untersuchung. In 45 Fällen wurden Genotypanalysen vorgenommen (G. Strebelow). Erstmals wurde bei zwei Rindern Border-Disease-Virus aus Blut bzw. Blut- und Ohrstanzprobe isoliert, die Typisierung ergab ein BDV-3. Serologische Verfolgsuntersuchungen mit differenzierenden Neutralisationstesten im Bestand ergaben Hinweise, dass das Virus sich im Rinderbestand perpetuiert (Zusammenarbeit mit A. Tavella). Eine virologische und serologische Untersuchung von 22 Schafbeständen eines Bundeslandes auf Pestiviren ergab eine Seroprävalenz von 6,7 %, bei einer Bestandsprävalenz von 22,7 %. Es gab sowohl Bestände mit dominanter BDV-Infektion, als auch Tiere mit eindeutiger BVDV-1-Infektion (Zusammenarbeit mit P. Hübert, U. Biesenbach). Aus Blutproben von Pyrenäengemsen *(Rupicapra pyrenaica)* wurde mehrfach BDV-4 isoliert (Zusammenarbeit mit E. Gilot).
Erstmals wurde vom NRL ein Ringtest zur BVD-Diagnostik durchgeführt, an dem sich 38 Untersuchungslabore aus Deutschland und benachbarten Ländern sowie der Industrie beteiligten. Insgesamt wurden 23 Serumproben, vier Kryostatschnitte (J. Teifke) und vier Ohrstanzproben zur Untersuchung in insgesamt sieben Untersuchungsverfahren versandt und die Ergebnisse ausgewertet. Diese bestätigen, von einzelnen abweichenden Ergebnissen abgesehen, eine verlässliche Qualität der eingesetzten Testkits und die Beherrschung der Untersuchungsverfahren durch die Labore.
Weiterhin wurden 17 Prüfungen im Rahmen von Zulassung- bzw. Chargenprüfungen von *In-vitro*-Diagnostika durchgeführt und Empfehlungen ausgesprochen, in zahlreichen Fällen Standards für die Labordiagnostik an den Untersuchungsämtern abgegeben und eine Überarbeitung des BVD-Teiles der amtlichen Methodensammlung für anzeigepflichtige Tierseuchen (TSN) vorgenommen.

OIE- und Nationales Referenzlabor für aviäre Influenza (Geflügelpest)
(T. Harder)

Das Jahr 2006 war geprägt durch die Ausbrüche von H5N1-HPAIV zunächst in Wildvögeln und begrenzt auf wenige Foci im Bundesgebiet. Sehr umfangreiche Monitoringuntersuchungen, die in den Laboratorien der Bundesländer durchgeführt wurden, führten zu 344 durch das NRL bestätigten Fällen bei Wildvögeln. Zusätzlich wurden auch natürliche Infektionen bei drei streunenden Katzen und einem Steinmarder aus einem Infektionsfokus auf der Insel Rügen nachgewiesen. Die sehr kritische Situation eines Ausbruchs von H5N1-HPAIV in einem mittelgroßen gemischten Geflügelbestand in Sachsen konnte durch rasche Diagnosestellung und rigorose tierseuchenrechtliche Maßnahmen noch im Indexbestand unter Kontrolle gebracht werden. Nachdem ab Anfang Mai bundesweit – und auch im übrigen Europa – der Ausbruch in der Wildvogelpopulation zum Erlöschen gekommen zu sein schien, deutete der singuläre Nachweis des H5N1-Virus bei einem Trauerschwan im Zoo Dresden Anfang August darauf hin, dass mit fortgesetzten Einträgen von H5N1-HPAIV aus weiterhin nicht genau identifizierten Quellen gerechnet werden muss.
Aufgrund des erheblichen Zeitdrucks, unter den die AI-Diagnostik zunehmend geriet, waren Umstellungen der Methodik hin zu einem völlig auf molekulare Techniken basierenden Arbeitsablauf erforderlich. Die eingesetzten Methoden wurden durch die Veröffentlichung des EU-Diagnostikhandbuches für AI zudem europaweit harmonisiert. In drei Fortbildungsveranstaltungen im FLI wurden die neuen validierten Methoden an die Landesuntersuchungseinrichtungen weitergegeben.
Neben den Nachweisen von H5N1-HPAIV konnte auch in diesem Jahr aus Wildvogelproben wieder ein umfassendes Spektrum niedrigpathogener AIV-Isolate (mindestens 48, Untersuchungen teilweise noch nicht abgeschlossen) gewonnen werden. Hierbei nehmen niedrigpathogene H5-Isolate eine anteilsmäßig bedeutende Stellung ein. Vor allem durch PCR-Diagnostik, weniger durch serologisches Screening, fielen in diesem Jahr auch sechs Hausgeflügelbestände mit aktiven AIV-Infektionen auf. In zwei Fällen wurde H5-LPAIV nachgewiesen, was zur Tötung der Bestände führte.
Das NRL hat sich an der Ausrichtung nationaler Ringtests durch INSTAND beteiligt und auch erfolgreich daran teilgenommen. Internationale Laborvergleichsversuche durch das EU-Referenzlabor (molekulare Diagnostik, Antigencharakterisierung), die Fa. GD (Niederlande; HAH-Antikörperdiagnostik) und die Veterinärfakultät Onderstepoort (Südafrika, molekulare Diagnostik) wurden ebenfalls erfolgreich bestritten.
Zahlreiche Stellungnahmen zu Fragen der Seuchenvorbeugung und -bekämpfung und zu diversen EU- und OIE-Dokumenten wurden im Rahmen der beratenden Tätigkeit für das BMELV erstellt. Die Leitung des NRL war an Arbeitsgruppen der EU KOM zur Erstellung des Diagnostikhandbuches sowie zur Formulierung von Leitlinien für das Wildvogelmonitoring beteiligt. Darüber hinaus war das NRL bei einer Arbeitsgruppe der EFSA zur Rolle von Wildvögeln in der Epidemiologie des H5N1-HPAIV vertreten.

Nationales Referenzlabor für Infektiöse Anämie der Einhufer
(P. König)

Die Infektiöse Anämie der Einhufer, auch als Equine infektiöse Anämie (EIA) bezeichnet, ist eine virale systemische Erkrankung der Pferde, Ponys, Esel, Maultiere und Zebras. Der Erreger, ein Lentivirus aus der Familie der Retroviren, verursacht eine fieberhafte Blutarmut, die vereinzelt tödlich verläuft. Die Erkrankung ist charakterisiert durch intermittierende Fieberschübe, Verlust an Körpermasse, Unterhautödeme und durch mehr oder weniger stark ausgeprägte Anämie. Generell ist ein akuter, chronischer oder ein klinisch unauffälliger Verlauf der Erkrankung möglich. In 30 – 90 % der Fälle treten keine Krankheitssymptome auf.
EIA ist weltweit verbreitet und tritt regional gehäuft in Nord- und Südamerika, Afrika, Asien, Australien sowie Süd- und Osteuropa auf. Sie kommt in nord- und mitteleuropäischen Länder nur sporadisch vor. Das Virus ist in Deutschland nicht heimisch, jedoch kommt es immer wieder zu vereinzelten EIA-Ausbrüchen.

	1993	1998	1999	2002	2006
Zahl der Ausbrüche in Deutschland	1	3	1	1	7

Die Übertragung erfolgt in erster Linie durch große blutsaugende Insekten wie Pferdebremsen und Wadenstecher (Tabanus, Stomoxys). Diese fungieren als mechanische Vektoren, d. h. sie können bei einer Unterbrechung der Blutmahlzeit an einem EIA-virusinfizierten Tier infektiöses Blut, welches an ihren

Mundwerkzeugen haftet, auf ein benachbartes empfängliches Tier übertragen. Das EIA-Virus bleibt aber nur für kurze Zeit infektiös (ca. 30 Minuten), daher kommt eine Übertragung über größere räumliche Distanzen hinweg nicht vor. Um eine Infektion regional zu etablieren, wird eine sehr hohe Bremsendichte vorausgesetzt, die üblicherweise in den mitteleuropäischen Klimazonen nicht erreicht wird.
Infizierte Tiere scheiden Virus mit Körpersekreten wie Speichel, Milch und Sperma aus. Eine Virusübertragung durch Exkretionen erfordert einen sehr engen Kontakt der Tiere. Eine etwaige Verschleppung durch Injektionskanülen und tierärztliche Instrumente ist durch Sorgfaltsmaßnahmen, wie Verwendung von Einwegmaterial und geeigneten Desinfektionsmitteln, auszuschließen. Weiterhin kann die EIA durch infizierte biologische Produkte übertragen werden.
Das Virus entzieht sich der Immunantwort durch die permanente Ausbildung von Varianten mit veränderten Antigeneigenschaften und kann daher nicht eliminiert werden. Infizierte Tiere bleiben lebenslang Virusträger und stellen potentielle Infektionsquellen dar. Die Krankheit ist in Deutschland anzeigepflichtig und wird durch die „Verordnung zum Schutz gegen die ansteckende Blutarmut der Einhufer" reglementiert, die eine Tötung positiver Tiere sowie Sperrung und Untersuchung der betroffenen Bestände und der Kontaktbetriebe vorschreibt.
Die Feststellung der Infektion erfolgt über den Nachweis von Antikörpern, die in der Regel bis spätestens 45 Tage nach der Infektion im Agargel-Immundiffusionstest (AGID, Coggins-Test) nachgewiesen werden können.
Im Herbst 2006 wurde die Erkrankung in insgesamt sieben Betrieben in Thüringen und Sachsen festgestellt. Zwei Pferde verstarben; insgesamt 21 weitere Tiere wurden auf amtliche Anordnung getötet. Epidemiologische Untersuchungen weisen auf Importtiere aus Rumänien als eine mögliche Infektionsquelle hin.
Am NRL für EIA wurden im Jahr 2006 insgesamt 193 Serum- und Organproben untersucht. Weiterhin wurden Proben von 18 Tieren zu wissenschaftlichen Untersuchungen wie Etablierung des Erregernachweises durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie Erregertypisierung eingesendet. Darüber hinaus wurden Einsendungen zur Diagnose und Differenzierung equiner Herpesviren bearbeitet.

Nationale Referenzlabore für Infektiöse Hämatopoetische Nekrose* und Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden* sowie für Infektiöse Anämie der Lachse und Koi-Herpesvirusinfektion****
(D. Fichtner* und S.M. Bergmann**)

Die Nationalen Referenzlaboratorien (NRL) für Fischseuchen haben die Diagnose virusbedingter Erkrankungen der Fische, vorrangig Fischseuchen, 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 Hämatopoetische Nekrose (IHN), zwei Krankheiten der Liste II der Aquakultur-Richtlinie der EU sowie die Infektiöse Anämie der Lachse (ISA), die in die Liste I eingeordnet wurde, aber in Deutschland bisher nicht aufgetreten ist. Seit Dezember 2005 besteht in Deutschland auch für die Koi-Herpesvirus (KHV)-Infektion der Karpfen Anzeigepflicht.
2006 wurden insgesamt 87 Organproben und Isolate (Zellkulturpassagen) von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss)* an die NRL zur Virusisolierung oder -identifizierung sowie zum Genomnachweis oder zur Genomanalyse eingesandt. Bei den isolierten und charakterisierten Viren handelte es sich um VHSV und um Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV).
Ergänzend zu den in der EU-Gesetzgebung zugelassenen Nachweismethoden wurde zur Bestätigung der Befunde die RT-PCR eingesetzt. Entsprechend den Vorschriften aus der Richtlinie 93/53 (EWG) wurden epizootiologische Untersuchungen durchgeführt, um die Herkunft verschiedener VHSV- und IHNV-Ausbrüche festzustellen. Als Methode wurde die genetische Analyse der Virusisolate durch Sequenzierung ausgewählter Genombereiche eingesetzt. Insgesamt wurden aus fünf Bundesländern 24 VHS-Isolate und 35 IHN-Isolate bearbeitet. In verschiedenen Fällen konnte die Herkunft der Viruseinschleppung verfolgt werden (P.-J. Enzmann).
In eingesandten Serumproben von Forellen wurden mittels ELISA Antikörper gegen VHSV, IHNV und IPNV nachgewiesen.
Das KHV verursachte in den letzten Jahren verlustreiche Krankheitsgeschehen bei Kulturkarpfen und beim Koi (Cyprinus *carpio*). Die PCR zum Nachweis von KHV-Genom wurde optimiert und erwies sich als geeignete Methode zur Diagnose von KHV-Infektionen. Im letzten Jahr wurden 39 Organproben, Isolate (Zellkulturpassagen) und Nukleinsäure-Präparationen von Nutzkarpfen an das NRL für KHV

eingesandt. In neun dieser Proben konnte KHV-Genom nachgewiesen werden. Neu ist die Isolierung eines Picornavirus aus verendeten Karpfen.
Aus Aalen *(*Anguilla *anguilla)* wurden wiederholt das Herpesvirus anguillae (HVA), Erreger der sogenannten „Rotkopfkrankheit", das Aal-Rhabdovirus, auch bezeichnet als Eel Virus European X (EVEX), und Reoviren isoliert und identifiziert. Bei Aalen gelang im letzten Jahr auch die Isolierung von Birnaviren, die sich als IPNV-like-Viren erwiesen. Die aus Aalen isolierten Picornaviren verursachten in einem Infektionsversuch bei Glasaalen eine Mortalität von 43 %.
Der Verdacht auf ISA-Virus bei einem eingesandten Isolat von Forellen konnte durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden.
Zier- und verschiedene Wildfische wurden auf Virusinfektionen untersucht. Bei Fischen aus dem „Bachforellen *(Salmo trutta fario)*-Sterben in Bayern" wurden weitere umfangreiche virologische und immunologische Untersuchungen durchgeführt. Viren oder Genome relevanter Erreger konnten nicht nachgewiesen werden.
In 27 von insgesamt 50 eingesandten Organproben von Koi-Karpfen konnte mittels PCR KHV-Genom festgestellt werden. Bei der Untersuchung von Goldfischen (*Carassius auratus auratus)* konnte 4mal KHV-Genom nachgewiesen werden. Organproben und fragliche Isolate von Giebel *(Carassius gibelio)*, Barsch *(Perca fluviatilis)*, Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis)* und Karausche (*Carassius carassius)* wurden mit negativem Ergebnis auf Viren untersucht.
Im Rahmen der Risikoabschätzung beim Import von Zierfischen war die Untersuchung auf EHNV-Genom negativ.
Gegenwärtig sind 35 Zelllinien an der „Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin" verfügbar.
MAk gegen KHV und ISAV wurden an eine Firma zur kommerziellen Herstellung übergeben und nach Prüfung als Diagnostikum zum Nachweis anzeigepflichtiger Krankheiten in Deutschland zugelassen. Weitere mAk gegen Iridoviren (Epizootic Haematopoeitic Necrosis Virus, EHNV, European Sheatfish Virus ESV und European Catfish Virus, ECV) und gegen das Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVC) wurden auf Spezifität und Sensitivität getestet (M. Dauber) und stehen für Forschung und Diagnostik zur Verfügung.
Die NRL nahmen wieder erfolgreich am jährlich stattfindenden Ringvergleich der Nationalen Referenzlaboratorien der Mitgliedsländer der EU teil, der vom EU-Referenzlabor in Aarhus, Dänemark durchgeführt wurde.
Beim jährlichen Treffen der Vertreter der Nationalen Referenzlaboratorien für Fischkrankheiten aus den Mitgliedsländern der EU wurde eine Analyse über Umfang und Struktur der Aquakultur, über Daten zur Epizootiologie, Diagnose und Bekämpfung der VHS und IHN sowie über Umfang und Ergebnisse der Laboruntersuchungen zu virusbedingten Fischkrankheiten in Deutschland vorgelegt.

Nationales Referenzlabor für Klassische Schweinepest
(K.R. Depner)

Die Aufgaben des Referenzlabors für klassische Schweinepest (KSP) leiten sich aus dem Aufgabenkatalog des EU-Referenzlabors für KSP (Richtlinie 2001/98EU) sowie aus dem Tierseuchengesetz ab.

Diagnostik
2006 gab es in der ersten Jahreshälfte acht Fälle von Klassischer Schweinepest bei Hausschweinen. Betroffen war das Bundesland Nordrhein-Westfalen. Bei Wildschweinen wurde die Seuche Ende des Jahres ebenfalls in Nordrhein-Westfalen diagnostiziert.

Einen Überblick über die diagnostische Arbeit am Referenzlabor gibt folgende Auflistung:

Anzahl Einsendungen	18
Anzahl Erregernachweise	16
Anzahl Antikörpernachweise	2

Referenzaufgaben
Zur Optimierung und Standardisierung der KSP-Diagnostik wurden die regionalen Untersuchungseinrichtungen mit dem Verschicken zahlreicher Referenzmaterialien (Virusstämme, Zellkulturen, Referenzseren, interne PCR-Kontrollen) unterstützt. Die Materialien dienten hauptsächlich zur Etablierung von Testmethoden für die CSF-Diagnostik und Differentialdiagnostik.

Chargenfreigabe von Diagnostika und Impfstoffen
Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Chargenprüfungen von KSP-Diagnostika und Impfstoffen.

Chargenfreigabe Antikörper-ELISA	22
Chargenfreigabe Antigen-ELISA	6
Chargenfreigabe KSP-Konjugat	3
Chargenfreigabe KSP-Vakzine	16

Nationales Referenzlabor für die Lungenseuche der Rinder
(M. Heller, E. Schubert)

Die Lungenseuche kommt nach wie vor in vielen Staaten endemisch vor. Sie ist insbesondere in Afrika weit verbreitet, wo 2004 nach offiziellen Angaben 20 Länder betroffen waren (aktuelles Vorkommen der Krankheit weltweit siehe unter http://www.oie.int/hs2/report.asp). Schwerpunkte der Verbreitung in Afrika bilden insbesondere die Sahel-Zone und an diese Zone angrenzende Länder. Hier ist nach einem Rückgang der Erkrankung in den 1970er und 1980er Jahren wieder eine höhere Prävalenz des Erregers zu verzeichnen.
In Asien wurden im April 1997 vorerst letztmalig Ausbrüche in Nepal und Khatar dokumentiert (OIE 2004). Allerdings bleibt die Situation hinsichtlich des Lungenseuchestatus in vielen Ländern Asiens weiterhin unklar. In Europa traten die letzten Fälle 1993 und 1999 auf, wobei Portugal und die französisch-spanische Grenzlinie betroffen waren. Frühere Ausbrüche gab es bis in die 1990er Jahre hinein in Spanien und Italien sowie bis Anfang der 1980er Jahre in Frankreich. Deutschland gilt seit 1926 als frei von Lungenseuche. Derzeitig gilt Europa nach wie vor als Lungenseuche-frei, wenngleich durch den zunehmenden Tierhandel jederzeit Einschleppungsgefahr besteht.
Im Berichtszeitraum wurden keine Verdachtsproben oder sonstigen Proben zur Untersuchung auf Lungenseuche an das NRL eingesandt.
Im Jahre 2006 wurde durch das NRL wieder ein Ringversuch für die serologische Lungenseuche-Diagnostik mittels Komplementbindungsreaktion (KBR) organisiert. Dabei sollten 15 Seren mit unterschiedlichem KBR-Titer untersucht werden. Insgesamt haben 16 Untersuchungsämter teilgenommen. In elf Labors ergaben sich gute bis sehr gute Übereinstimmungen mit den Vorgaben des NRL. Im Ergebnis wurden alle negativen Seren als solche erkannt. Bei den positiven Seren wichen einige Ergebnisse der einzelnen Labors um ein bis zwei Titerstufen ab, wodurch fragliche Proben zum Teil als positiv bzw. negativ beurteilt wurden. Insgesamt konnte der Ringversuch zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht werden.
Unter der Leitung des NRL Lungenseuche wurde auch 2006 die Fortentwicklung des bundeseinheitlichen Tierseuchenbekämpfungshandbuches (Unterarbeitsgruppe Lungenseuche) im Rahmen der Task Force Tierseuchenbekämpfung fortgeführt. Nunmehr steht der Entwurf des Handbuches im Tierseuchennetzwerk auch als bundeseinheitliche Ausgabe zur Verfügung. Um auch zukünftig eine ausreichende Aktualität des Handbuches zu gewährleisten, ist die jährliche Überarbeitung vorgesehen.
Alle zur Differentialdiagnostik der Lungenseuche bedeutsamen Mykoplasmenstämme des Rindes wurden im Berichtszeitraum wiederum entsprechend der Notwendigkeit gepflegt (Überprüfung auf Wachstum sowie Identität, Anlegen neuer lyophilisierter Konserven).

Nationales Referenzlabor für Maul- und Klauenseuche und differenzialdiagnostisch bedeutsame Viren
(B. Haas)

Die Aufgaben des Nationalen Referenzlabors für Maul- und Klauenseuche ergeben sich aus der Richtlinie 2003/85/EU in Verbindung mit der MKS-Verordnung und der Tierimpfstoff-Verordnung. Gleichzeitig werden die Referenzlaboraufgaben für die vesikuläre Schweinekrankheit und die 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.
Weitere Aufgaben sind die Import-/Export-Diagnostik, die Prüfung sowie die fachliche Unterstützung bei der Zulassung von Impfstoffen und Diagnostika sowie die Beratung des BMELV und der DG SANCO

bezüglich der Weiterentwicklung der Rechtsvorschriften für die MKS und die SVD. Der Leiter des MKS-Referenzlabors ist zudem Mitglieder der *"Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease"* der FAO. Im Auftrag der FAO wurde die Wirkung einer A22-Vakzine gegen eine Belastungsinfektion mit A Egypt 2006 im Infektionsversuch am Rind geprüft und ein Schutzwert von 10,56 PD50 gefunden.
Das MKS-Referenzlabor hat 2006 die deutschen Länder bei der Etablierung einer nationalen Testkitbank unterstützt. Seit dem 1. Oktober 2006 hat Deutschland eine MKS Testkitbank, die es erlaubt, bis zu 200.000 Seren pro Woche in regionalen Untersuchungsämtern auf Antikörper gegen Nichtstrukturproteine zu testen.

Nationales Referenzlabor für Milzbrand
(M. Elschner, A. Raßbach)

Im Berichtszeitraum wurden zwei Organproben auf *Bacillus* (B.) *anthracis* untersucht. Dabei wurden verschiedene Kulturmedien eingesetzt. Weiterhin erfolgte die Untersuchung der Proben mit verschiedenen PCR-Systemen (Nested PCR / Realtime PCR). Die PCR, welche als Zielregion ein chromosomales Gen hatte, ergab für zwei Proben positive Resultate. Bei dieser Nested-PCR reagieren aber neben *B. anthracis* auch andere Vertreter der Gattung *Bacillus*, wie *B. thuringiensis* und *B. cereus*, positiv. Die Nested-PCRs, welche ihre Zielregionen auf den Virulenzplasmiden pX01 und pX02 haben, verliefen negativ. Das Vorhandensein virulenter Stämme von *B. anthracis* im Untersuchungsmaterial konnte damit ausgeschlossen werden und bestätigte die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen.
Das Referenzlabor nahm an einem EU-weiten Ringversuch zur Diagnostik von Anthrax teil.

OIE- und Nationales Referenzlabor für Newcastle Disease
(C. Grund)

Die *Newcastle Disease* ist eine hochkontagiöse Infektionskrankheit des Geflügels, die weltweit vorkommt. Im Jahre 2006 wurden insgesamt 17 Ausbrüche an die O.I.E. gemeldet, von denen sieben europäische Länder betroffen waren. In Deutschland war im Jahr 2006 kein Ausbruch zu verzeichnen.
Auslösendes Agens der Newcastle Disease sind virulente Vertreter der aviären Paramyxoviren des Serotyp 1 (APMV-1). Die Diagnostik muss einen Erregernachweis mit Sero- und Pathotypisierung erbringen. Aufgrund der hohen Kontagiosität sollten die angewandten Methoden eine schnelle Diagnose erlauben. Um diesen Anspruch zu erfüllen, hat das Referenzlabor sein Methodenspektrum um eine RT *real-time* PCR erweitert, die einen Erregernachweis direkt im Probenmaterial ermöglicht und darüber hinaus eine Bestimmung des Pathotyps erlaubt. Die Sequenzierung der entstehenden DNS-Fragmente erlaubt zudem die Charakterisierung des Erregers auf Genomebene. In Erweiterung der Methodik nach Wise et al. 2004, ist es durch die Entwicklung einer spezifischen Sonde möglich, auch schwach pathogene APMV-1 positiv zu identifizieren. Die Methode wurde mit Referenzstämmen evaluiert und mit diagnostischem Material erprobt. Zusätzlich wurde der PCR-Nachweis in einem internationalen Ringtest erfolgreich überprüft. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit den klassischen Methoden. Bei einzelnen APMV-1-Isolaten von Wassergeflügel war die herkömmliche Diagnostik mit Erregeranzucht im embryonierten Hühnerei und Bestimmung des Pathotyps durch den ICPI-Test notwendig.
Das Probenaufkommen war im Jahre 2006 rückläufig. In 20 Einsendungen von nationalen Untersuchungseinrichtungen wurden aviäre Paramyxoviren nachgewiesen. Davon waren 17 dem Serotyp 1 zuzuordnen. Der überwiegende Anteil der APMV-1-haltigen Proben stammte von Tauben und war dem Taubentyp zuzuordnen, darunter ein PPMV-1-Isolat aus einer Stadttaube. Die anderen vier APMV-1-Isolate wurden in Proben von Enten nachgewiesen, die im Rahmen des AIV-Wildvogelmonitorings beprobt wurden. Dabei handelte es sich um lentogene bzw. mesogene Pathotypen. Drei weitere APMV-Isolate wurden als APMV-3, APMV-6 und APMV-8 identifiziert. Sie stammten von einem Strauß (*Struthio camelus*), von einer Flugente (*Cairina moschata*) sowie von einer Wildgans. Von ausländischen Einrichtungen kamen 47 Proben zur Untersuchung, wobei in 21 Proben virulentes APMV-1 mittels *real-time*-RT-PCR nachweisbar war. Diese stammten von Houbaras (4), Greifvögeln (9), Tauben (6) und Wachteln (2).

Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose
(H. Köhler, P. Möbius)

Im Jahre 2006 stand die Evaluierung diagnostischer Verfahren zur *Intra-vitam*-Diagnostik der Paratuberkulose im Mittelpunkt der Tätigkeit des NRL für Paratuberkulose. Dazu gehörten Verfahren zur Isolierung von DNA aus Kotproben vom Rind für den Direktnachweis von *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis (MAP) mittels PCR sowie die kulturelle Anzüchtung von MAP mit Hilfe eines automatisierten Flüssigkultursystems.
Seit Mitte des Jahres steht je ein definiertes Panel an Serum- und Milchproben für die Evaluierung serologischer Testverfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP zur Verfügung. Die Gewinnung der negativen Seren und Milchproben erfolgte bei Paratuberkulose-unverdächtigen Kühen aus historisch Paratuberkulose-unverdächtigen Beständen, die positiven Proben wurden von Kühen gewonnen, bei denen Paratuberkulose durch den kulturellen Erregernachweis im Kot bestätigt worden war.
Im Oktober 2006 wurden 15 definierte Proben für einen Ringversuch zum kulturellen Nachweis von MAP in Kotproben von Rindern an 23 Untersuchungseinrichtungen in Deutschland und Luxemburg versandt. Die Ergebnisse dieses Ringversuches werden im Mai 2007 vorliegen.
Im Jahr 2006 wurden sieben Chargenprüfungen für ELISA-Tests durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die Bearbeitung eines Zulassungsverfahrens für einen weiteren ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP, das aber noch nicht abgeschlossen ist.
Im Rahmen der EU Co-ordination Action SSPE-CT-2004-501903 „Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases" wurde vom 26.-29.04.2006 in Jena der Workshop "Laboratory Diagnosis of *Mycobacterium* spp." veranstaltet, an dem Wissenschaftler aus 24 europäischen Instituten teilnahmen.
Am 11. und 12. Oktober 2006 fand die 3. Arbeitstagung des Nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose in Jena statt. Zum Gelingen dieses Symposiums, in dessen Mittelpunkt u. a. auch Fragen der Pathogenese und Diagnostik der Paratuberkulose standen, trugen etwa 100 Experten aus dem öffentlichen Veterinärwesen, von Universitäten und Forschungseinrichtungen Deutschlands sowie aus den Niederlanden, Belgien, Frankreich und einigen osteuropäischen Staaten bei.

Nationales Referenzlabor für Psittakose
(K. Sachse)

Im Jahre 2006 erhielt das NRL insgesamt 213 Verdachtsproben zur Untersuchung auf aviäre Chlamydiose, d.h. Psittakose bzw. Ornithose. Darunter befanden sich 106 humane Proben, in denen nur 3mal *Chlamydophila (Cp.) psittaci* nachgewiesen wurde, sechs weitere enthielten andere Chlamydienarten. Die restlichen 107 Verdachtsproben stammten von Psittaciden (77, davon 28 *Cp.-psittaci*-positiv), Geflügel (zehn, davon sechs positiv) und weiteren Vogelarten (20, davon sechs positiv). Das gegenüber dem Vorjahr leicht gestiegene Probenaufkommen dieser Gruppe resultiert offensichtlich aus dem Inkrafttreten der novellierten Psittakose-Verordnung, welche den Spezies-spezifischen Nachweis des Erregers zur Feststellung der Psittakose festschreibt. Ein Großteil der eingesandten aviären Proben war zur Bestätigung und Speziesdifferenzierung durch das NRL vorgesehen. Die Notwendigkeit einer exakten Speziesdifferenzierung ergibt sich schon aus der Tatsache, dass auch bei Vögeln gelegentlich andere Chlamydien vorkommen, z.B. *Cp. abortus*, so dass die konventionellen Tests falsch-positive Ergebnisse liefern würden. Vor diesem Hintergrund fand der unten beschriebene Ringversuch statt.
Die humanen Proben stammten sowohl von Einzelpatienten mit Psittakoseverdacht (acht, davon zwei *Cp.-psittaci*-positiv), als auch aus einer Studie zu Personen aus der Landwirtschaft (42, davon sieben Chlamydien-positiv) und einem Verdachtsgeschehen im mikrobiologischen Labor (56, davon zwei Chlamydien-positiv). Das NRL hat im vergangenen Jahr seine Kontakte zur Humanmedizin weiter intensiviert, um die Leistungsfähigkeit der hier entwickelten neuen Diagnostikverfahren zu vermitteln und das Bewusstsein für mögliche zoonotische Fälle von Psittakose/Ornithose zu erhöhen.
Des Weiteren war das NRL über seine Labordiagnostik an einer Studie zu Chlamydieninfektionen in 15 Milchviehbeständen Nordrhein-Westfalens beteiligt. Zwischen September 2004 und Dezember 2005 wurden insgesamt 2.057 Proben aus Auge, Nase, Scheide und Milch sowie pro Tier zwei Serumproben entnommen. Die Nachweisraten aus den PCR-Untersuchungen betrugen in den einzelnen Betrieben zwischen 13 und 100 %. Die Speziesdifferenzierung ergab *Cp. abortus* in den positiven Milchproben und *Cp. pecorum* in den Tupferproben. Serologisch waren 42 % der Proben in beiden Untersuchungen (im Abstand von drei Wochen) positiv und 37% negativ. In Nasentupfern der Jungtiere und Scheidentupfern der Kälber wurden deutlich häufiger Chlamydien gefunden als bei den anderen Altersgruppen. Ähnlich wie in früheren Studien konnte keine direkte Korrelation zwischen positivem Chlamydiennachweis und erkennbaren Krankheitssymptomen bei den betreffenden Tieren hergestellt werden. Dieser Umstand sollte aber auch im Lichte neuerer Studien betrachtet werden, die im subklinischen Bereich durchaus signifikante Unterschiede zwischen Chlamydien-Trägern und Chlamydien-freien Rindern aufzeigten.
Diagnostisch-methodische Aktivitäten: Das NRL organisierte in Zusammenarbeit mit dem AVID im Berichtszeitraum einen Ringversuch zur Chlamydiendiagnostik. Dabei wurden jeweils 25 Proben von den

16 teilnehmenden Laboren mit zwei unterschiedlichen *real-time* PCR-Methoden getestet, einer Nachweismethode für *Chlamydiaceae* (23S-rtPCR) und einer für *Cp. psittaci* (ompA-rtPCR). Die Mindestanforderung, die richtige Erkennung von 70% der Proben, wurde von allen Teilnehmern problemlos erfüllt. Die beiden getesteten Methoden erwiesen sich als geeignet zum Einsatz in der Routinediagnostik.
Der DNA-Mikroarraytest (AT-Test) wurde in einer gemeinsamen Validierungsstudie mit der Universität Zürich an 339 diagnostischen Proben geprüft und anhand der Vergleichsdaten aus verschiedenen PCR-Tests, Zellkultur und Immunhistochemie ebenfalls als geeignet für die Routinediagnostik von Chlamydieninfektionen befunden.

Nationales Referenzlabor für Rauschbrand
(C. Seyboldt)

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 sind anzeigepflichtig. *Clostridium* (*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 ist über die Wuchsform auf verschiedenen Nährböden und die Immunfluoreszenz möglich, jedoch ergibt insbesondere die Differenzierung über die Wuchsform nur selten eindeutige Ergebnisse. Eine Alternative zur Abgrenzung von *C. chauvoei* und *C. septicum* ist ein PCR-Nachweis nach den Angaben von Kuhnert et al. (1996, 1997).
Anhand von 17 Feldisolaten und des Typstammes von *C. chauvoei* (ATCC 10092) wurde die Aussagekraft von kulturellen Methoden, der direkten Immunfluoreszenz und der PCR zur Identifikation von *C. chauvoei* untersucht und verglichen.
Erregernachweis durch kulturelle Methoden: Für die Basisdiagnostik wurden Nährmedien verwendet, auf denen Clostridien optimal wachsen und charakteristische Wuchseigenschaften zeigen: Blutagar zur Beurteilung der Hämolyse, Glucose-Hefeextrakt-Cystein-Agar zur Beurteilung der Wuchsform, Lactose-Eigelb-Agar zur Beurteilung der Laktosespaltung, Lecithinase- und Lipasebildung. Die Bebrütung erfolgte unter anaeroben Bedingungen.
Erregernachweis durch direkte Immunfluoreszenz: Mit Hilfe von FITC-markierten polyklonalen Antikörpern (VMRD Inc.) war es möglich, *C. chauvoei* aus Kulturausstrichen nachzuweisen. Aus eigenen Untersuchungen ergaben sich Hinweise darauf, dass der Nachweis aus älteren Kulturen, insbesondere Bouillonkulturen, problematisch sein kann. Voraussetzung für einen *C. chauvoei* Nachweis ist die Identifikation von IF-positiven Stäbchen, da Kreuzreaktionen des Anti-*C. chauvoei* FITC mit Spirochäten vorkommen können.
Erregernachweis durch PCR: Nach der Amplifikation mit dem Primerpaar 16S UNI-L/R (Kuhnert et al. 1996, 1997) erhält man ein Amplifikat von etwa 1.400 bp. Dieses Amplifikat wird mit *Ssp*I verdaut, um zwischen *C. chauvoei* und *C. septicum* unterscheiden zu können. Im Fall von *C. chauvoei* Isolaten erhält man drei Restriktionsprodukte von 1.020, 186 und 171 bp, während sich bei *C. septicum* nur zwei Fragmente nachweisen lassen (1020 und 357 bp). Mit dem Primerpaar CC 16S-L/R erhält man von *C. chauvoei* und *C. septicum* (*C. septicum* meist schwach oder nicht nachweisbar) ein 960 bp Amplifikat, während andere nahe verwandte Spezies wie *C. carnis* nicht reagieren. Durch den Verdau mit *Ssp*I kann das Vorliegen von *C. chauvoei* DNA (118 bp, 186 bp, 655 bp) verifiziert werden (*C. septicum*: 304 bp, 655 bp) (Kuhnert et al. 1996, 1997).
Ergebnis: Aufgrund variabler morphologischer Eigenschaften ist eine eindeutige Differenzierung von *C. chauvoei* und *C. septicum* durch kulturelle Methoden erschwert und meist nicht möglich. Die Identifizierung von 17 Feldisolaten und dem Typstamm von *C. chauvoei* war durch direkte Immunfluoreszenz zuverlässig möglich. Der Nachweis von *C. chauvoei* mittels PCR und anschließendem Restriktionsenzymverdau gelang in Übereinstimmung mit dem Immunfluoreszenznachweis bei allen 17 Feldisolaten sowie beim Typstamm. Die Zuverlässigkeit der beiden Methoden konnte somit gezeigt werden.

Nationales Referenzlabor für Rotz
(M. Elschner)

Tierseuchenrechtliche Regelungen im internationalen Handel mit registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden erfordern serologische Untersuchungen mittels KBR. Die Aufgabe des Referenzlabors umfasst insbesondere die Unterstützung der Untersuchungseinrichtungen bei diesen Untersuchungen und die Durchführung von Abklärungsuntersuchungen bei positiven KBR-Befunden. Im Jahr 2006 wurden insgesamt 121 Seren von Pferden sowie ein Serum vom Menschen auf Antikörper gegen *B. mallei* untersucht.
Im Frühjahr erhielt das Referenzlabor die Serumprobe eines Pferdes mit klinischem Rotzverdacht. Dieses Tier war aus Brasilien als Hobbypferd nach Deutschland importiert worden. Nach einem positiven KBR-Ergebnis erfolgte eine Bestätigungsuntersuchung mittels Westernblot, der ebenfalls ein positives Ergebnis erbrachte. Zur Abklärung wurde eine zweite Serumprobe untersucht und im Referenzlabor in der KBR und im Westernblot ebenfalls mit positivem Ergebnis getestet. Die zuständige Veterinärbehörde ordnete die Tötung des Tieres an. Das Tier wurde dem FLI für weitere diagnostische Untersuchungen und eine anschließende diagnostische Sektion übergeben. Die Detektion von *B. mallei*-spezifischen Gensequenzen in der Lunge mittels *real-time* PCR und der Nachweis von *B. mallei*-Antigen mittels monoklonaler und polyklonaler Antikörper ließen auf eine Rotz-Infektion schließen.
Die Verbesserung der Diagnostik ist eine weitere Aufgabe des NRL. Die Eignung eines Immunoblots als Bestätigungstest wird weiterhin getestet. Außerdem nahm das NRL an einem internationalen Ringversuch für die Diagnostik von *B. mallei* und *B. pseudomallei* teil.

Nationales Referenzlabor für Salmonellose der Rinder
(U. Methner)

Ein wesentlicher Schwerpunkt der Aufgaben des NRL Salmonellose der Rinder sind Untersuchungen zur Epidemiologie der Salmonellose in Rinderbeständen, insbesondere zur Wirksamkeit von eingeleiteten Bekämpfungsmaßnahmen nach amtlicher Feststellung der Salmonellose in einem Bestand. Damit sollen auch allgemeingültige Erkenntnisse gewonnen werden, um eine bessere Beratungsfunktion gewährleisten zu können. Im Berichtszeitraum wurden durch das NRL Salmonellose der Rinder in Zusammenarbeit mit den zuständigen Veterinärbehörden und den Untersuchungsämtern drei Ausbrüche an Rinder-Salmonellose durch eigene mikrobiologische Verfolgsuntersuchungen begleitet. Dadurch konnten die Übertragungswege und die Ursachen für das Zirkulieren der Salmonellen in den Beständen als Grundlage für herdenspezifische Interventionsmaßnahmen identifiziert werden. Beim NRL sind verschiedene molekulare Methoden zur Erregerfeindifferenzierung eingearbeitet, um die Infektionsquellen und die Infektionswege besser analysieren zu können. Da in Deutschland gegenwärtig nur noch in Ausnahmefällen gegen die Salmonellose des Rindes prophylaktisch immunisiert wird, sollen auch die Auswirkungen von Immunisierungen mit Lebend- und Inaktivatimpfstoffen gegen Salmonellen in bereits infizierten Beständen untersucht werden.
Darüber hinaus wurden im NRL vergleichende bakteriologische Untersuchungen durchgeführt. Im Unterschied zur Standard-Methode ISO 6579 wird die bakteriologische Untersuchung von Kotproben nach Rinder-Salmonellose-Verordnung ohne Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser durchgeführt. Außerdem wird für die Untersuchung von Probenmaterial tierischen Ursprungs eine Modifikation der Methode ISO 6579 angestrebt, die darin besteht, dass die beiden flüssigen Selektivmedien nur durch das modifizierte halbfeste Rappaport-Vassiliadis-Medium (MSRV) ersetzt werden. In unseren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die *Salmonella*-Nachweisrate nach Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser um ca. 20 % höher als nach direkter Anzucht in flüssigen Selektivmedien war. MSRV erwies sich bei Kotproben vom Rind als geeignetes Selektivmedium. Da die Identifizierung der *Salmonella*-ausscheidenden Rinder sehr wichtig für die Sanierung des Bestandes ist, sollten die Möglichkeiten einer Modifizierung der gültigen Methodik diskutiert werden.
Ein weiterer umfangreicher Arbeitsschwerpunkt des NRL Salmonellose der Rinder sind Prüfungen zur Zulassung und Chargenbewertung von ELISA-Testsystemen zum Nachweis von Antikörpern gegen Salmonellen bei allen Tierarten. Im Jahre 2006 wurden insgesamt 29 Prüfungen von Salmonellen-ELISA-Testsystemen für die Tierarten Geflügel und insbesondere Schwein durchgeführt.

Nationales Referenzzentrum für BSE/Scrapie
(M. Groschup, A. Buschmann)

Das FLI nimmt die Aufgaben des NRL für die BSE- und Scrapie-Diagnostik wahr. Im Jahr 2006 wurden 73 BSE- und 29 Scrapie-Verdachtsfälle mit Hilfe von in der EU zugelassenen OIE-Methoden (SAF-Immunoblot und/oder immunhistochemische Untersuchung) abgeklärt. Bei 16 Rindern und 25 Schafen bestätigte sich der BSE- bzw. Scrapie-Verdacht. Bei den epidemiologischen Untersuchungen von kleinen Wiederkäuern, Schweinen und Wildwiederkäuern stehen die Mitarbeiter des Referenzlabors für beratende Unterstützung zur Verfügung. Insbesondere bei der Überwachung der kleinen Wiederkäuer wurden im Jahr 2006 Diskussionen über die tierseuchenrechtliche Bewertung der atypischen Scrapiefälle geführt.
Das NRL für BSE/Scrapie nahm 2006 wieder an Ringversuchen (Veterinary Laboratory Quality Assessment) des EU-Referenzlabors in Großbritannien, VLA, teil. Es wurden insgesamt vier Ringversuche zur histologischen BSE-und Scrapie-Untersuchung durchgeführt (davon drei Versuche zur korrekten Beurteilung histologischer Präparate sowie ein Versuch zur korrekten Färbung und Beurteilung von Präparaten). Zur histologischen Bewertung wurden wieder jeweils zehn HE-gefärbte Schnitte und zehn immunhistologisch gegen PrP gefärbte Gehirnschnitte von TSE-positiven und TSE-negativen Rindern und Schafen aus dem VLA erhalten. Diese Schnitte wurden beurteilt und die Ergebnisse an das VLA weitergeleitet. Zur immunhistologischen Färbung mit anschließender Beurteilung wurden sechs Präparate (Rind und Schaf) erhalten.
Weitere Ringversuche des EU-Referenzlabors überprüften die ordnungsgemäße Durchführung der TSE-Schnelltestuntersuchungen (je sieben Schnelltest-Präparate vom Rind und vom Schaf) sowie der Bestätigungsuntersuchungen (je fünf Proben vom Rind bzw. vom Schaf) im NRL. Die in die diagnostischen Arbeiten involvierten wissenschaftlichen Mitarbeiter nahmen regelmäßig an Arbeitstreffen des EU-Referenzlabors am VLA, Weybridge, Großbritannien teil.
Des weiteren wurde seitens des NRL im Jahr 2006 wieder ein Ringversuch mit allen an der TSE-Diagnostik beteiligten Schnelltestlabors (staatlich und privat) durchgeführt. Hierbei wurden 41 Probensets an 29 Laboratorien (manche Labors wenden mehr als ein Testsystem an) mit je acht Proben (verschiedene BSE-Verdünnungsstufen sowie negative Proben) versandt. Diese Sets enthielten vier negative und vier positive Proben, wobei eine positive Probe im Grenzwertbereich lag.
Im Ergebnis erkannten 27 Laboratorien alle obligatorischen Proben korrekt. Ein Labor erkannte die schwach reaktive Probe nicht und ein Labor hatte einen falsch-positiven Befund, der im Wiederholungsset richtig erkannt wurde. Die Ergebnisse des Ringtests belegen den hohen Stand der diagnostischen Qualität in allen Labors.
Darüber hinaus werden die praktischen Prüfungen sowie die fachbezogene Dokumentenprüfung im Rahmen der Zulassung und Chargenprüfungen von den in Deutschland zur Anwendung kommenden TSE-Schnelltests durchgeführt. Im Rahmen der laufenden Chargenprüfung für die bereits zugelassenen Schnelltests wurden insgesamt 32 Chargen geprüft und deren Freigabe durch die Zulassungsstelle vorbereitet.

WHO-Referenzzentrum für Tollwut; OIE- und Nationales Referenzlabor für Tollwut
(T. Müller)

Das NRL für Tollwut und WHO/OIE Referenzlabor für Tollwut des FLI war in 2006 an einem WHO Projekt zur Entwicklung eines monoklonalen Antikörper (mAk)-Cocktails für die post-expositionelle Impfung beim Menschen beteiligt. Im Rahmen des Projektes wurden die IU/mg Verhältnisse der fünf potentiellen murinen anti-Glycoprotein-mAk Kandidaten (darunter mAk E559 des FLI) als Voraussetzung für die *in vivo* Testung im Hamstermodell bestimmt. Das WHO Referenzlabor des FLI wurde durch die WHO beauftragt, ein technisches Dossier anzufertigen. Darüber hinaus wurden zwei weitere anti-Glycoprotein-mAk 17C7 (human) und D1 (Maus) zu Vergleichszwecken *in vitro* gegen verschiedene Lyssavirus-Genotypen und Tollwutvirusvarianten unterschiedlicher geographischer Herkunft getestet.
Das WHO Referenzzentrum für Tollwut des FLI war 2006 an der Organisation der OIE/WHO/EU Konferenz: ‚Towards Rabies Elimination in Eurasia', Paris, 27-30 Mai 2006 beteiligt.
Das WHO-CC am FLI beantwortet regelmäßig Anfragen jeglicher Art zur Tollwut, auch aus dem Ausland, und übernimmt in Amtshilfe labordiagnostische Untersuchungen für die Humanmedizin. Das Referenzlabor hat erfolgreich an einem internationalen Ringversuch zur serologischen Diagnostik von Hunde- und Katzenseren im Rahmen der Einreise in tollwutfreie Regionen teilgenommen. In 2006 wurde

der zweite nationale Ringversuch zur Tollwutdiagnostik mit internationaler Beteiligung durch das NRL des FLI durchgeführt.

Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Tuberkulose
(I. Moser)

Die Erreger der Tuberkulose bei Mensch und Tier werden im *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTC) zusammengefasst, dem heute folgende Spezies zugeordnet werden: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microtii* und *M. pinnipedii*. Die 16S rDNA ist bei allen oben genannten Spezies des MTC identisch. Die Zugehörigkeit zum MTC wird mittels PCR erfasst. Die exakte Spezies wird dann mittels „Spoligotypisierung" ermittelt, eine Methode, bei der in einer Kombination von PCR und DNA-DNA-Hybridisierung die „Direct Repeat-Region" auf dem Mykobakterienchromosom analysiert wird. Eine weitere, recht diffizile Methode, die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) auf der Basis der Insertionssequenz *6110*, kann auf Grund ihrer großen Differenzierungskapazität zur Abklärung epidemiologischer Zusammenhänge angewandt werden. Die noch relativ neue Methode der Typisierung aufgrund von „variable number of tandem repeat (VNTR)"-Sequenzen, besitzt ebenfalls sehr gutes diskriminatorisches Potenzial, ist jedoch weniger aufwändig als die RFLP-Analyse, da sie methodisch allein auf der PCR basiert. Dabei werden bis zu 24 chromosomale Loci, die kurze repetitive Sequenzen enthalten, analysiert, indem die Anzahl der Repetitionen bestimmt wird. Diese Methode wird die RFLP-Analyse in Zukunft möglicherweise ablösen. Sie wurde im Referenzlabor etabliert.
Nicht zum MTC gehörende Mykobakterien (*M. avium* und andere atypische Mykobakterien) werden mittels spezifischer PCR-Reaktionen, DNA-Sequenzanalysen der 16S rDNA, des hsp65-Gens oder mittels PCR-Restriktionsanalysen identifiziert.
Aus Organproben werden die Erreger auf Spezialnährmedien angezüchtet und danach mittels einer oder mehrerer der genannten molekularen Methoden charakterisiert. Die Kultivierung gilt noch immer als „Goldstandard" und sicherste Nachweismethode. Die teilweise langen Kultivierungszeiten können durch den Einsatz teurer flüssiger Nährmedien verkürzt werden. Um die dennoch relativ lange Zeit bis zur Diagnosestellung abzukürzen, wird bei Verdacht auf das Vorliegen einer Infektion mit Erregern des MTC die mykobakterielle DNS mittels PCR direkt in Organextrakten nachgewiesen. Dadurch kann der Prozess der Diagnosestellung auf wenige Tage verkürzt werden. Das Ergebnis der PCR wird durch DNS-Sequenzanalyse des PCR-Produktes verifiziert. Der PCR-Befund wird durch Anzüchtung des Erregers bestätigt.
Im Jahre 2006 wurden insgesamt 187 Organproben von 87 Tieren verschiedener Spezies und 48 Bakterienisolate von verschiedenen Tierarten auf das Vorliegen von Tuberkulose-Erregern oder atypischen Mykobakterien untersucht. Die Proben stammten von 23 Rindern, sieben Hühnern, 35 Tieren, die zu den Haustieren/Heimtieren zu rechnen sind, sieben exotischen Tieren (Lama, Robbe, Tapir, Psittaziden) und 15 Wildtieren.
Zur Verbesserung der Forschung zu Diagnose und Epidemiologie von Mykobakterien-Infektionen in Europa war im Jahre 2004 ein Netzwerk „VENoMYC, Co-ordinated Action SSPE-CT-2004-501903" gegründet worden. Innerhalb dieses Netzwerkes wurde von den Referenzlabors für Paratuberkulose und für Tuberkulose im April 2006 in Jena ein internationaler Workshop „Laboratory Diagnosis of *Mycobacterium* Species" organisiert. Weiterhin nahm das Referenzlabor für Tuberkulose innerhalb dieses Netzwerkes an einem EU-weiten Ringversuch zur Methode der VNTR-Typisierung teil, der im Frühjahr 2007 abgeschlossen sein wird. Unabhängig vom Netzwerk „VENoMYC" wurde von den Referenzlabors für Tuberkulose und Paratuberkulose im Oktober 2006 die „3. Arbeitstagung Mykobakterien-Infektionen" am Friedrich-Loeffler-Institut durchgeführt, an der WissenschaftlerInnen aus Deutschland, Belgien, Frankreich, den Niederlanden, der Ukraine, Lettland und Polen teilnahmen (www.dvg.net). Schwerpunkte dieser Tagung waren „Diagnose und Epidemiologie der Tuberkulose und der Paratuberkulose".

Nationales Referenzlabor für Vibrionenseuche der Rinder
(H. Hotzel)

Campylobacter (*C.*) *fetus* subsp. *venerealis* ist der Erreger der bovinen genitalen Campylobacteriose (bgC) - früher, aber auch noch in der Neufassung der Rinder-Deckinfektionen-Verordnung vom 20. Dezember 2005, als Vibrionenseuche der Rinder bezeichnet. Diese venerische Infektionskrankheit ist 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.
Die traditionelle Differenzierung zwischen den Subspezies von *C. fetus* basiert auf sieben phänotypischen Schlüsselreaktionen, wobei eine eindeutige Zuordnung nur durch den Glycin-Toleranztest möglich ist. *C. fetus* subsp. *fetus* verhält sich tolerant gegenüber 1% Glycin, während Isolate von *C. fetus* subsp. *venerealis* unter identischen Bedingungen intolerant sind. Dabei ist für eine Gesamtbewertung der Resultate wichtig, dass eine Phänotypisierung nur unter streng kontrollierten Bedingungen, wie z. B. die gleiche Inokulumgröße, vergleichbare und zuverlässige Ergebnisse liefert. Die anderen untersuchten phänotypischen Differenzierungsreaktionen zeigten zum Teil deutlich unterschiedliches Verhalten und erlaubten keine exakte Zuordnung der Isolate zu den *C.-fetus*-Subspezies. Die Ergebnisse des Glycin-Toleranztests stimmten in den Untersuchungen von 103 Stämmen 100%ig mit denen einer Subspezies-spezifischen PCR überein.
Ende 2005 fand eine Beratung zur Diagnostik der bgC statt, an der Vertreter des NRL, regionaler Untersuchungseinrichtungen, Veterinärämter und der Praxis teilnahmen. Es wurden Standpunkte zur Probengewinnung und –verarbeitung erarbeitet. Als geeignete Spülflüssigkeit wurde ein Thioglykolat-haltiges Medium für die Präputialspülproben empfohlen, welches das Wachstum der *Campylobacter* nicht negativ beeinflusst, aber das die Begleitflora wie *Proteus* sp. unterdrückt. Als Konsequenz aus den Diskussionen wurde eine Untersuchungsreihe zur Überlebensfähigkeit von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* und bakterieller Kontaminanten, wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa* und *Proteus vulgaris*, in verschiedenen Spülflüssigkeiten initiiert. Verschiedene *C.-fetus*-subsp.-*venerealis*-Stämme zeigten dabei in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration eine unterschiedlich lange Überlebenszeit in Gegenwart von Luftsauerstoff. Diese Zeit fiel mit geringer werdender Ausgangskonzentration schnell ab, was bei niedriger Keimzahl und langem Zeitraum zwischen Probennahme und Anlegen der Kulturen leicht zu falsch negativen Befunden führen kann.
Bedauert wurde, dass gegenwärtig kein kommerzieller Impfstoff zur Verfügung steht. Es soll versucht werden, Impfstoffhersteller für ein solches Projekt zu interessieren.
Im Jahre 2006 wurden 31 Isolate, die als verdächtig für *C. fetus* subsp. *venerealis* galten, aus sechs Institutionen untersucht. Die Untersuchungen mittels PCR und DNA-Sequenzierung diagnostizierten 21mal *C. fetus* subsp. *venerealis* und 2mal *C. fetus* subsp. *fetus*. Vier Isolate gehörten nicht der Spezies *C. fetus* an, sondern erwiesen sich nach DNA-Sequenzierung der 16S-rRNA-Gene als *C. hyointestinalis*. Ein weiteres Isolat konnte als *C. sputorum* identifiziert werden. Die anderen Isolate gehörten nicht zur Gattung *Campylobacter*. Interessanterweise wurde erstmals nach mehr als zwanzig Jahren wieder *C. fetus* subsp. *venerealis* im Norden Deutschlands nachgewiesen.

Nationales Referenzlabor für Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen
(F. Melzer)

Die Aufgaben des Referenzlabors umfassen die Unterstützung der Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer bei der Überwachung der Brucellosefreiheit in den landwirtschaftlichen Nutztierbeständen. In diesem Rahmen werden im Referenzlabor Abklärungsuntersuchungen durchgeführt, die kommerziell angebotenen und zugelassenen Diagnostika (ELISA, Antigene, Kontrollseren) durch Chargenprüfungen qualitativ überwacht bzw. neue Produkte in Zusammenarbeit mit der Zulassungsstelle überprüft und Mangeldiagnostika zur Verfügung gestellt. Im NRL werden außerdem Probenmaterialien aus dem humanmedizinischen Bereich untersucht.
Im letzten Jahr wurden im Referenzlabor insgesamt 155 Serumproben zur Abklärung unklarer Befunde oder Feststellung der Brucellosefreiheit von Einzeltieren an das NRL gesandt. Im Einzelnen waren das 29 Proben vom Rind, 18 vom Schwein und 43 vom Schaf bzw. von der Ziege. Vier untersuchte Seren stammten von Antilopen, zwei von Kamelen, eines vom Wildschwein und eines vom Zebu. In der Mehrzahl der Fälle ergaben die Untersuchungen Hinweise auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *Yersinia enterocolitica* O9. Dabei wurden verschiedene serologische Untersuchungsmethoden parallel angewendet. Spezifische Brucella-Antikörper konnten nur beim Wildschwein nachgewiesen werden.
Wie schon im Jahr 2005 wurden auch 2006 exakt 99 Serumproben vom Schaf für den Export auf Antikörper gegen *B. ovis* untersucht und negativ befundet. Die weitaus größere Zahl solcher Untersuchungen wird in regionalen Laboratorien durchgeführt, denen das NRL auf Anfrage *B. ovis*-Antigen zur Verfügung stellt. Dies gilt auch für die *B.-canis*-Diagnostik, die außerdem kommerziell angeboten wird, so dass nur ein Hundeserum im NRL getestet (negativ) wurde.

Im Berichtszeitraum wurden zwei Bakterienisolate vom Schwein (Kreuzung aus Wildschwein und Landrasse) und vier Isolate vom Wildschwein als *Brucella suis* Biotyp 2 differenziert.
Von 22 humanen Kulturen konnten 17 als *Brucella melitensis* spezifiziert werden. Bei fünf Kulturen konnten *Brucella* spp. ausgeschlossen werden.
Im Jahre 2006 nahm das NRL an einem europäischen Ringversuch zur Identifizierung und Differenzierung von *Brucella suis* auf Biovarebene teil. Wir stellten fünf eigene Isolate für das Ringversuchspanel zur Verfügung, welches insgesamt 67 Isolate aus ganz Europa umfasste. Die Auswertung des Ringversuchs ergab eine große Übereinstimmung der Ergebnisse der Teilnehmer bei den meisten Methoden. Es wurde allerdings auch klar, dass bei einzelnen Methoden eine größere Übereinstimmung in den Protokollen erzielt werden muss, um Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Nationales Referenzlabor für Kontagiöse Equine Metritis
(F. Melzer)

Bei der Kontagiösen Equinen Metritis (CEM: Contagious Equine Metritis) handelt es sich um eine bakterielle, venerische Infektionskrankheit bei Pferden, die durch *Taylorella equigenitalis* hervorgerufen wird. Die diagnostische Untersuchung auf CEM erfolgt durch Erregeranzucht aus Genitaltupferproben von Stuten und Hengsten und werden durch die Untersuchungseinrichtungen der Länder und durch private Laboratorien durchgeführt. Die Hauptaufgabe des Referenzlabors besteht in der Unterstützung dieser Einrichtungen im Rahmen ihrer diagnostischen Tätigkeit, z.B. bei der Einführung molekularbiologischer Differenzierungsmethoden.
Im Jahr 2006 wurden sechs eingesandte Stämme als *Taylorella equigenitalis* identifiziert. Dabei handelte es sich um Material aus weiter zurückliegenden Jahren, das uns zur Errichtung einer Stammsammlung zugesandt worden war.
Das NRL war an der logistischen Organisation eines europaweiten Ringversuchs beteiligt und hat neben anderen deutschen Laboren selbst teilgenommen. Dabei konnten alle fünf Proben richtig diagnostiziert und typisiert werden.

Nationales Referenzlabor für die Trichomonadenseuche der Rinder
(K. Henning)

Trichomonaden sind kleine einzellige Organismen, die bei vielen Wild- und Haustieren nachgewiesen werden können. Meistens handelt es sich um nicht-pathogene Kommensalen oder sie verursachen relativ mild verlaufende Erkrankungen. Zu den klinisch bedeutsamen Angehörigen dieser Gruppe gehört die Spezies *Tritrichomonas foetus*, der Erreger der Trichomonadenseuche des Rindes.
Zum Nachweis des Erregers werden bei Kühen in der Regel Vaginaltupfer, bei Stieren Präputialspülproben entnommen, welche in ein Kulturmedium überführt werden. Neben dem Kulturmedium nach Diamond stehen seit längerer Zeit kommerzielle Kultursysteme zur Verfügung, deren Verwendung für die *Trichomonaden*-Untersuchung zulässig ist (InPouch™ TF, Biomed Diagnostics, White City, OR, USA). Das Kulturmedium wird über mehrere Tage mikroskopisch auf beginnendes Wachstum der Parasiten untersucht. Sie sind aufgrund ihrer rollenden und ruckartigen Bewegungen leicht als Trichomonaden zu identifizieren. Der Erreger kann auch in nach Giemsa gefärbten Ausstrichpräparaten direkt nachgewiesen werden. Dieses Verfahren gilt jedoch als weniger sensitiv als die Kultivierung.
Problematisch ist jedoch die weitere Differenzierung, bzw. die Verwechslungsmöglichkeit von *T. foetus* mit anderen Trichomonaden. Hier spielen insbesondere Kontaminationen mit Flagellaten aus dem Darmtrakt eine Rolle. Eine Differenzierung von *T. foetus* gegenüber kontaminierenden Trichomonaden kann mittels PCR erfolgen.

Nationales Referenzlabor für Caprine Arthritis/Enzephalitis und Maedi/Visna
(D. Beier)

Im Auftrag des OIE wurde im Berichtszeitraum zur Herstellung eines Maedi-Visna-Referenzserums ein Internationaler Ringtest mit einem definierten positiven Serumpool aus Schafseren durchgeführt. An diesem Ringtest nahmen insgesamt elf nationale Referenzlabors und Testkithersteller (Frankreich, Italien, Schweiz, Polen, Deutschland) unter Anwendung verschiedener diagnostischer Testsysteme (ELISA, AGIDT, Westernblot) teil. Die Untersuchungsergebnisse differierten zum Teil erheblich. Über die Zusammensetzung des Referenzserums (Einzelserum oder Serumpool, Art des Verdünnungsmediums) und die konservierende Behandlungsmethode (Gamma-Bestrahlung, Lyophilisation o.ä.) konnte bisher

zwischen den prüfenden Labors keine einheitliche Meinung erzielt werden. Die Herstellung des Referenzserums ist noch nicht abgeschlossen.
Im Berichtszeitraum wurden vier kommerzielle Testkits einer Zulassungsprüfung unterzogen.

Nationales Referenzlabor für Muschelkrankheiten
(S.M. Bergmann)

Im Jahr 2006 wurden wiederholt Pazifische Austern (*Crassostrea gigas*) und Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) an das NRL für Muschelkrankheiten eingesandt. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen eines Austernsterbens an der Nordseeküste. In den Austern konnten histologische Veränderungen, vor allem bei weiblichen Tieren, beobachtet werden. Das Gewebe um die Eier zeigte eine starke Degeneration und hämozytäre Infiltration, die Kiemenepithelien waren teilweise komplett zerstört. Bei männlichen Tieren wurden die Veränderungen nur im Kiemengewebe, aber in einem weitaus geringeren Maße, festgestellt. In den Präparaten von Miesmuscheln waren keinerlei Veränderungen zu erkennen.
Sowohl aus Austern als auch aus Miesmuscheln wurde ein Erreger in CHSE-214-Zellen isoliert, der sehr langsam über 3-5 Wochen bei 20 °C wächst. Die elektronenmikroskopische Untersuchung verlief negativ. Das Agens wird derzeit weiter bearbeitet.

Nationales Referenzlabor für durch Zecken übertragene Krankheiten (NRL-ZüK)
(J. Süss)

In Deutschland ist die wichtigste durch Zecken übertragene Viruserkrankung die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und die wichtigste durch Zecken übertragene bakterielle Erkrankung die Lyme Borreliose (LB). Weitere durch Zecken übertragene Erkrankungen sind z.B. Babesiose, Anaplasmose 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.
Das VIII International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases (IPS-VIII) wurde vom 10.-12. März 2005 in Jena durchgeführt und stand unter der Hauptthematik „RISK“. Ausgewählte wissenschaftliche Beiträge wurden im International Journal of Medical Microbiology (IJMM 296S1(2006), pp. 1-316) publiziert, nachdem sie zuvor durch jeweils zwei unabhängige Experten referiert worden waren. Die gesamten Koordinierungsarbeiten dafür wurden vom NRL geleistet. Der Band kann in begrenzter Stückzahl angefordert werden unter jochen.suess@fli.bund.de.
Das IX. Symposium wurde für März 2007 vorbereitet und steht unter der Thematik „Climate Change“. Dafür sind bisher über 100 wissenschaftliche Beiträge angemeldet.
Das NRL-Zük bietet folgende Leistungen an: Beratung und Vorträge zu medizinischen und veterinärmedizinischen Fragen der FSME, Borreliose und anderer durch Zecken übertragener Krankheiten einschließlich Zeckenprophylaxe, Beurteilung von FSME-Risikogebieten, Untersuchungen zum FSME-Virusnachweis in Zecken (nRT-PCR) sowie in Liquor- und Serumproben, Unterstützung bei der Abklärung von Borrelioseverdachtsfällen durch Antikörpernachweis (ELISA, Westernblot).

Nationales Referenzlabor für Nipah/Hendra
(R.G. Ulrich und M.H. Groschup)

Einen Schwerpunkt unserer Untersuchungen bildet die Entwicklung von Diagnostikmethoden für neue und wiederkehrende Viren, so genannte „emerging viruses“. Dabei handelt es sich um Zoonoseerreger, die entweder neu in der menschlichen Bevölkerung auftreten, oder um solche, die bereits existent waren, jedoch bisher unentdeckt geblieben sind oder sich in ihrer Virulenz oder Verbreitung verändert haben. Das Auftreten von Infektionen mit diesen Viren verläuft oft zyklisch mit epidemischen Verläufen. Zu diesen Viren werden die Nipah- und Hendraviren gezählt. Die Forschungsarbeiten hierzu beschränken sich angesichts des Fehlens geeigneter Isolier-Labors am FLI bisher auf den Aufbau entsprechender Kooperationsbeziehungen.

Nationales Referenzlabor für die Enzephalitis-Virus-Erkrankung bei Pferden
(U. Ziegler und M.H. Groschup)

Die Pferdeenzephalomyelitis (Eastern, Western, Venezuelan, Equine Encephalomyelitis – EEE, WEE, VEE) ist eine durch Alphaviren (Familie *Togaviridae*) hervorgerufene, bei Pferden of letal verlaufende Erkrankung, die sich in der Hauptsache auf den amerikanischen Kontinent beschränkt. Sie hat Bedeutung als Zoonose und besonders bei WEE spielen Infektionszyklen zwischen Vögeln, kleinen Säugetieren und Moskitos (Culex-Arten) die Hauptrolle. Diese Erkrankung ist differentialdiagnostisch relevant für andere Arbovirusinfektionen, wie z.B. West-Nile-Virus. Die Diagnostik der virusbedingten Pferdeenzephalomyelitis beschränkt sich zur Zeit auf serologische Untersuchungen.

Referenzlaboratorien	**Rechtsgrundlage**
Afrikanische Schweinepest (Diagnostik nur am FLI)	EU RL 92/119 sowie Ausführungshinweise zur Schweinepest-VO
Ansteckende Schweinelähmung (Teschen-Talfan-Disease)	EU RL 92/119 in Verb. mit SVD-VO bzw. Änderung der Sperrbezirks-VO
Arthritis-Enzephalitis der Ziege	BMELV-Auftrag
Aujeszkysche Krankheit	EU Entsch. 93/24 in Verb. mit EU RL 64/432 und 93/244 sowie Aujeszky-VO
Beschälseuche der Pferde	Tierseuchengesetz § 4 Abs. 2
Bovine Herpesvirus 1-Infektionen	EU RL 93/42 in Verb. mit EU RL 95/109 und BHV-1-VO
Bovine Virusdiarrhöe	VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 20.12.2005; BMELV-Auftrag
Brucellose	Brucellose-VO i.d.F. der Bek. vom 20.12.2005 und Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG geändert durch Verordnung (EG) Nr. 535/2002 vom 21. März 2003
Contagiöse Equine Metritis	Bekanntmachung vom 22. Dezember 2005: Nationale Referenzlaboratorien für anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten Entscheidung 93/197/EWG der Kommission vom 5. Februar 1993 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen und die Beurkundung für die Einfuhr von registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden
Enzootische Rinderleukose (EBL)	EU RL 64/432 in Verb. mit EU RL 97/12 und Leukose-VO
Exotische Tierseuchen (Afrikanische Pferdepest, Blauzungenkrankheit, Epizootische Hämorrhagie der Hirsche, Lumpy-skin-Krankheit, Pockenseuche der Schafe und Ziegen, Pest der kleinen Wiederkäuer, Rinderpest, Virusbedingte Pferdeenzephalo-myelitiden, Rifttal-Fieber) (Diagnostik nur am FLI)	EU RL 92/119 in Verb. mit VO Anzeigepflichtige Tierseuchen und Tierimpfstoff-VO
Fischkrankheiten (VHS, IHN, ISA, KHV)	EU RL 93/53 in Verb. mit EU RL 91/67 und EU RL 92/532 Fischseuchen-VO
Geflügelpest	Geflügelpest-VO in Verb. mit EU RL 92/40
Infektiöse Anämie der Einhufer	VO-Ansteckende Blutarmut der Einhufer
Klassische Schweinepest	EU RL 80/217 in Verb. mit Schweinepest-VO und Tierimpfstoff-VO
Lungenseuche der Rinder	EU RL 82/894 VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 11.04.2001
Maedi/Visna	BMELV-Auftrag
Maul- und Klauenseuche (Diagnostik nur am FLI)	EU RL 85/511 in Verb. mit MKS-VO und Tierimpfstoff-VO
Milzbrand	VO zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen
Muschelkrankheiten	EU RL 95/70 in Verb. mit EU RL 91/67
Newcastle Disease	Geflügelpest-VO in Verb. mit EU RL 92/66

Referenzlaboratorien	**Rechtsgrundlage**
Paratuberkulose	BMELV-Auftrag
Pferdepest (Diagnostik nur am FLI)	EU RL 92/35 in Verb. mit VO Anzeigepflichtige Tierseuchen
Psittakose	Psittakose-VO, Neufassung vom 20.12.2005
Q-Fieber	VO über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 20.12.2005; BMELV-Auftrag
Rauschbrand	VO zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen
Rotz	Richtlinien zur Feststellung von Rotz (Malleus) bei Einhufern durch serologische und allergologische Untersuchungsverfahren vom 7. Mai 1974 in der Fassung vom 1. Juli 1979 Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 20.12.2005 Binnenmarkt-Tierseuchenschutz-Verordnung Entscheidung 93/197/EWG der Kommission vom 05.02.1993
Salmonellose der Rinder	VO über anzeigepflichtige Tierseuchen Rinder-Salmonellose-VO
Stomatitis vesicularis	VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 20.12.2005; BMELV-Auftrag
Tollwut	Tollwut-VO, Neufassung vom 20.12.2005, in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 20.12.2005
Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	EU-VO 999/2001 in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 20.12.2005
Trichomonadenseuche der Rinder	VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 20.12.2005; BMELV-Auftrag
Tuberkulose der Rinder	Zoonosenrichtlinie 92/117/EWG (ABl. EG Nr. L 62/93)
Vesikuläre Schweinekrankheit	VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 20.12.2005; BMELV-Auftrag
Vibrionenseuche der Rinder	VO zum Schutz gegen übertragbare Geschlechts-krankheiten der Rinder in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen
durch Zecken übertragene Krankheiten	Erlass des Bundesministeriums für Gesundheit vom 19.11.1999 auf der Grundlage von Art. 3 in Verbindung mit Art. 4 der Richtlinie 92/117/EWG des Rates vom 17.12.1992 über Maßnahmen zum Schutz gegen bestimmte Zoonosen bzw. ihre Erreger bei Tieren und Erzeugnissen tierischen Ursprungs zur Verhütung lebensmittelbedingter Infektionen und Vergiftungen (ABl. EG L62/93, S. 38), Bundesanzeiger Nr. 227, S. 19559 vom 01.12.1999

V. ORGANISIERTE VERANSTALTUNGEN

Conraths, F.J.: Diagnostic Workshop on protozoal abortions in farm ruminants (COST 854 in cooperation with Complutense University of Madrid), Madrid, Spanien, 14.-16.06.2006

Conraths, F.J.: Protozoal reproduction losses in farm ruminants (COST 854 – Final Conference), Liège, Belgien, 06.-09.09.2006

Conraths, F.J.: Symposium "Protozoal Reproduction Losses in Farm Ruminants" bei der International Conference on Parasitology (ICOPA 2006) in Glasgow, Schottland, 11.08.2006

Heller, M. und Schubert, E.: Sitzung der Arbeitsgruppe Lungenseuche zur Fortentwicklung des bundeseinheitlichen Tierseuchenbekämpfungshandbuches im Rahmen der Task Force Tierseuchenbekämpfung, Sababurg, 21.06.2006

Kramer, M.: Mitwirkung bei der Organisation des Epidemiologie-Workshops im Rahmen des EU-Forschungsprojektes „Epidemiology and control of Classical Swine Fever (CSF) in wild boar and potential use of a newly developed live marker vaccine", Acronym: CSFVACCINE&WILD BOAR, Wusterhausen, 05.-06.04.2006

Köhler, H., Möbius, P., Borrmann, E., Moser, I. und Gottschaldt, J.: Workshop Laboratory Diagnosis of Mycobacterium spp., EU Coordination Action SSPE-CT-2004-501903 Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases, Jena, 26.-29.04.2006

Kramer, M.: Mitwirkung bei der Organisation des Workshops „Applied Epidemiology" – EU Twinning-Project between Bosnia and Herzegowina and Germany in the AGRICULTURAL SECTOR, Support for the Alignment of Turkey with the EU Veterinary Acquis CARDS No. BA05 IB AG 01, Sarajewo, 22.-23.11.2006

Kramer, M., Staubach, C. und Kämer, D.: Organisation und Durchführung einer Simulationsübung zur Bekämpfung eines angenommenen Ausbruchs von Klassischer Geflügelpest für Amtstierärzte in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, dem Friedrich-Loeffler-Institut und dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, AKNZ Ahrweiler, 17.-19.10.2006

Kramer, M., Staubach, C. und Teske, K.: Organisation und Durchführung einer HPAI-Simulationsübung für Amtstierärzte in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, dem Friedrich-Loeffler-Institut und dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, AKNZ Ahrweiler, 31.01.-02.02.2006

Mettenleiter, Th.C.: Klausurtagung der Staatssekretäre der für die Lebensmittelsicherheit und Tiergesundheit zuständigen Ministerien des Bundes und der Länder zu BSE-Schutzmaßnahmen, Insel Riems, 08.-09.02.2007

Moser, I., Köhler, H. und Möbius, P.: 3. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, Jena, 11.-12.10.2006

Neubauer, H. und Vergnaud, G.: Workshop MLVA typing of Brucella isolates. COST Action 845, WG 5, Paris, Frankreich, 27.-28.03.2006

Reinhold, P.: 8. Workshop des Arbeitskreises Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Nürnberg, 29.-30.03.2006

Reinhold, P.: 24th Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society „Respiratory Infections and Zoonoses“ in cooperation with the Friedrich-Loeffler-Institut and the study group “Comparative Pathology and Pathophysiology of the Respiratory System of the German Veterinary Medical Society” and 9. Workshop des Arbeitskreises “Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems” der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Jena, 08.-10.10.2006

VI. PRESSE- UND ÖFFENTLICHKEITSARBEIT

Die Presse- und Öffentlichkeitsarbeit wurde 2006 vom Thema aviäre Influenza dominiert. Unter der Bezeichnung „Vogelgrippe“ war das Thema fast das ganze Jahr über, allerdings mit Schwerpunkt im Februar und März, in den Medien präsent. Von Vertretern der Print- und Onlinemedien, Hörfunk und Fernsehen gingen zahllose Anfragen für Interviews und zu Hintergrundinformationen ein. Daraus entstanden neben tagesaktuellen Meldungen und Einschätzungen der Situation viele Reportagen über das Institut, u.a. auch ein ca. 30-minütiger Film des Bayerischen Rundfunks mit dem Titel „Allein unter Viren“. Bundesminister Horst Seehofer informierte sich am 23. Februar am FLI auf der Insel Riems über die Arbeiten zum Thema. Im Anschluss nahmen 40 Medienvertreter an einem Pressegespräch teil.
Das FLI gab zahlreiche Presseinformationen, ein Faltblatt und verschiedene Informationen auf der Internetseite heraus. Außerdem wurden Hunderte von Anfragen aus der Bevölkerung per Telefon, Brief und E-mail beantwortet.

Weitere Schwerpunktthemen in der Öffentlichkeitsarbeit bildeten die Ausbrüche von Blauzungenkrankheit im August in Nordrhein-Westfalen und von equiner infektiöser Anämie der Einhufer bei Pferden in Thüringen im September. Auch hierzu informierte das FLI über Pressemitteilungen sowie die Internetseiten und beantwortete zahlreiche Anfragen der Medien und aus der Bevölkerung. Der Ausbruch der Schweinepest in Nordrhein-Westfalen im März brachte kurzzeitig ein verstärktes Interesse vor allem regionaler Medienvertreter. Ein Fall von Rotz bei einem importierten Pferd aus Brasilien im Juni führte ebenfalls zu verstärktem Medieninteresse. Ab dem Sommer rückten die durch Zecken übertragenen Krankheiten, bedingt durch die deutlich erhöhten Erkrankungsfälle an FSME beim Menschen, verstärkt ins Blickfeld der Öffentlichkeit.

Neben dem aktuellen Tierseuchengeschehen informierte das FLI über verschiedene Themen aus der Forschung, , z. B. über die erfolgreiche Entwicklung eines Microarrays zur Chlamydiendiagnostik am FLI in Jena sowie eines zweiten Prototyps für einen Markerimpfstoff gegen Geflügelpest am FLI Insel Riems. Darüber hinaus war das FLI mit Themen wie BSE, Tollwut, Hantavirus- und *Neospora caninum*-Infektionen gefragt.

Am Girls’ Day / Zukunfsttag 2006 erhielten über 50 interessierte Schülerinnen und Schüler Einblicke in die Arbeit des FLI auf der Insel Riems und in Wusterhausen.

Aus dem Terminkalender
23. Februar: Bundesminister Horst Seehofer besucht das FLI auf der Insel Riems und informiert sich zum Thema aviäre Influenza
27. April: Girls’ Day /Zukunftstag
28. April: Der Senat der Bundesforschungsanstalten wählt Prof. Thomas Mettenleiter zum neuen Präsidenten
10. Juni: Tag der offenen Tür am FLI Wusterhausen im Rahmen der „Landpartie Brandenburg“
10. August: Sigrid Keler, Finanzministerin Mecklenburg-Vorpommern, informiert sich auf der Insel Riems über die Arbeit des Instituts
10. September: Tag des offenen Denkmals auf der Insel Riems - Führungen mit Station Heizhaus und Hauptgebäude
24. Oktober: Dr. Christian Patermann, Europäische Kommission, Leiter Bereich Forschung, besucht das FLI auf der Insel Riems mit einer internationalen Journalistendelegation
24. November: Der Club der Agrardiplomaten aus Berlin besucht das FLI auf der Insel Riems

VII. WISSENSCHAFTLICHE ZUSAMMENARBEIT

Zusammenarbeit mit anderen Institutionen und Organisationen

Inland

Agrar- und Umweltanalytik GmbH/JenaGen GmbH, Jena
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstökologie und Walderfassung, Eberswalde
Bundesinstitut für Risikobewertung
Bundeswehr München, Institut für Mikrobiologie
Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Clondiag Chip Technologies, Jena
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Pharmazeutisches Institut; Institut für Transfusionsmedizin; Institut für Medizinische Mikrobiologie; Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Fachbeirat Forum Impfen
FILT Forschungsgesellschaft für Lungen- und Thoraxerkrankungen mbH, Berlin-Buch
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf
Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb), Bad Langensalza
Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin: Institut für Veterinär-Physiologie; Institut für Bakteriologie und Tierseuchen; Institut für Veterinär-Biochemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena: Institut für Medizinische Mikrobiologie; Institut für Ernährungswissenschaften; Klinikum
Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung, Jena
Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, Roßlau
Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin
Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin
Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Geflügelkrankheiten; Institut für Parasitologie; Institut für Veterinär-Pathologie; Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Landesamt für Ernährungswirtschaft und Jagd NRW, Düsseldorf
Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten Nordrhein-Westfalen, Forschungsstelle für Jagdkunde und Wildschadenverhütung, Bonn
Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Dummerstorf
Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei, Institut für Fischerei, Versuchsanlage Born
Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart
Landeskontrollverband Rheinland-Pfalz e.V., Bad Kreuznach
Landkreis Soest, Veterinärdienst
Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Schweinegesundheitsdienst, Münster
Niedersächsische Tierseuchenkasse, Hannover
Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Riemser Arzneimittel AG, Greifswald-Insel Riems
Robert-Koch-Institut, Berlin und Wernigerode
Ruhr-Universität Bochum, Abteilung für Allgemeine und Spezielle Pathologie
Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
Städtisches Klinikum Pforzheim, Klinik für Neurologie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Virologie; Institut für Wildtierforschung; Zentrum für Infektionsmedizin, Abteilung Fischkrankheiten; Institut für Mikrobiologie; Institut für Pathologie
Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Poing
Tierpark Stralsund, Hansestadt Stralsund
Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz
Thüringer Tierseuchenkasse, Weimar
Tiergesundheitsdienst Thüringen e. V., Bad Langensalza
Tiergarten Heidelberg
Umweltforschungszentrum Halle-Leipzig, Halle

Universität Bonn, Landwirtschaftliche Fakultät
Universität Dortmund, Fachbereich Statistik
Universität Freiberg, Institut für Stochastik
Universität Freiburg, Institut für Virologie
Universität Hohenheim, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik
Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät: Institut für Bakteriologie und Mykologie; Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik
Universität München, Sonderforschungsbereich Räumliche Statistik
Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Potsdam
Universität Rostock, Institut für Bodenkunde, AG Agrobiotechnologie, Rostock
Universitätskliniken Göttingen, Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universitätsklinikum Essen, Institut für Virologie, Essen
Veterinäruntersuchungsämter und Fischgesundheitsdienste der Bundesländer
VIASYS Healthcare GmbH, Würzburg
Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, Koblenz

Ausland

Agence Française de Securité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Ploufragan, Frankreich
Agence Française de Securité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité Zoonoses Bactériennes, Maisons-Alfort, Frankreich
Animal Health Service, Deventer, Niederlande
Animal Health Trust, Newmarket, Großbritannien
Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), Department of Defense, Washington, D.C., USA
AVIA-GIS, Zoersel, Belgien
Bundesamt für das Veterinärwesen, Bern, Schweiz
Bundesministerium für Soziale Sicherheit und Generationen der Republik Österreich
Bundesuniversität von Bahia, Tierärztliche Hochschule, Salvador de Bahia, Brasilien
Central Institute for Animal Disease Control, CDIC-Lelystad, The Netherlands
Central Veterinary Institute, Budapest, Ungarn
Central Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin, Irland
Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, Vereinigte Arabische Emirate
CIDC, WUR, Lelystad, Niederlande
CIRAD, Montpellier, Frankreich
CISA-INIA, Valdeolmos, Spanien
CODA, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brüssel, Belgien
Colorado State University, USA
Cornell University Ithaca, New York, Department of Population Medicine and Diagnostic Sciences, College of Veterinary Medicine, USA
Danish Institute for Food and Veterinary Research, Aarhus, Dänemark
Danish Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, Dänemark
Departamento de Patología, conZOOlting wildlife management, Barcelona, Spanien
Direction Générale de l'Alimentation, Paris, Frankreich
DLO-Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad, Niederlande
Erasmus University, National Influenza Centre, Rotterdam, Niederlande
Europäische Kommission
Federal University Rio Grande do Sul, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pathology, Porto Alegre, Brasilien
FGI Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russland
Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (EUFMD), Rom, Italien
Fujita Health University, Toyoake, Aichi, Japan
Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER), Tremlade, Frankreich
Institut für klinische Veterinärmedizin, Charkow, Ukraine
Institut für Virologie und Immunprophylaxe, Mittelhäusern, Schweiz
Institute for Animal Health, Compton und Pirbright, Großbritannien

Institute of Diagnostic and Animal Health, Bukarest, Rumänien
Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Charkov, Ukraine
Institute of Genetics and Microbiology, Paris Sud, Orsay, Frankreich
Instituto de Investigaciones Recursos Cinegeticos (IREC), Ciudad Real, Spanien
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, und Sezione Diagnostica di Pavia, Pavia, Italien
International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenia
International Research Centre, Pentlands Science Park, Edinburgh, Großbritannien
JAS Biologicals Ltd., Cambridge, Großbritannien
Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, Kumasi, Ghana
Leiden University, Department of Medical Microbiology, Leiden, Niederlande
Liverpool School of Tropical Medicine, Department of Parasitology, Liverpool, Großbritannien
Ministry of Agriculture, State Veterinary Service, Armenien
Ministry of Agriculture, State Veterinary Service, Azerbaijan
Ministry of Agriculture, Forestry and Food of the Republic of Slovenia, Ljubljana, Slowenien
Ministry of Agriculture and Forestry of the Republic of Croatia, Zagreb, Kroatien
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, General Directorate of Protection and Control, Ankara, Türkei
Moredun Research Institute, Edinburgh, Großbritannien
National Diagnostic and Research Veterinary Institute, Sofia, Bulgarien
National Research Institute of Aquaculture, Tamaki, Mie, Japan
National Veterinary Institute, Uppsala, Schweden
National Veterinary and Food Research Institute (EELA), Helsinki, Finnland
National Veterinary Laboratory Vilnius, Litauen
Office National de la Chasse et de la Faune Surage, Gières, Frankreich
OIE Collaborating Centre for EBL, Weybridge, Großbritannien
OIE Reference Laboratory for EBL, Uppsala, Schweden
OIE Reference Laboratory on Rabies, National Centre on Veterinary and Food Studies (AFSSA), Malzéville, Frankreich
Oregon State University, College of Veterinary Medicine, Department of Biomedical Sciences, Corvallis, Oregon, USA
Oxford University, Department of Zoology, Großbritannien
PIWET, Pulawy, Polen
Polish Academy of Sciences, Institute of Nature Conservation, Polen
Quantitative Veterinary Epidemiology Group (QVE), Animal Sciences Group, Wageningen UR, Division of Infectious Diseases, Niederlande
Queens GIS Lab, Queen's University, Kingston, Ontario, Kanada
School of Veterinary Medicine, Department of Pathobiological Sciences, Baton Rouge, Louisiana, USA
State Veterinary Administration of the Slovak Republic, Slowakische Republik
State Veterinary Institute, Budapest, Ungarn
State Veterinary Institute Zvolen, Slowakische Republik
Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala, Schweden
Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Ruminant Medicine and Veterinary Epidemiology, Uppsala, Schweden
The Hebrew University – Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel
The Queen's University of Belfast, Nordirland
The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksborg, Dänemark
Tufts University, School of Veterinary Medicine, MA, USA
United States Department of Agriculture, Beltsville, USA
Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Dpto. Patologia Animal, Madrid, Spanien
Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Murcia, Spanien
Universidade de Sao Paolo, Faculdade de Medicina Veterinaria, Sao Paolo, Brasilien
Universität Bern, Institut für Parasitologie; Institut für Veterinärbakteriologie; Bern, Schweiz
Universität Zürich, Institut für Veterinärpathologie, Zürich, Schweiz
Universitätsklinik Innsbruck, Österreich
Universität Innsbruck, Institut für Hygiene und Sozialmedizin, Österreich
University College Dublin, Faculty of Veterinary Medicine, Dublin, Irland
University of Aveiro, Department of Biology, Aveiro, Spanien

University of Barcelona, Department of Animal Biology, Barcelona, Spanien
University of Belgrade, Belgrad, Serbien
University of Bologna, Section of Microbiology, Bologna, Italien
University of Davis, California, USA
University of Gdansk, Biotechnology, Dep. Molecular Virology, Gdansk, Polen
University of Ghent, Institute of Virology; Dept. of Molecular Biotechnology, Gent, Belgien
University of Illinois, Department of Pathobiology, Illinois, USA
University of Lancaster, Department of Statistics, Großbritannien
University of Liège, Faculty of Veterinary Science, Lüttich, Belgien
University of Malaga, Spanien
University of Namur, Belgien
University of Nottingham, School of Veterinary Medicine and Science, Großbritannien
University of Padua, Italien
University of Southampton, Großbritannien
University of Szczecin, Department of Agriculture, Polen
University of Tromsø, Norwegen
University of Wisconsin, Madison, USA
VAR/CODA, Ukkel, Belgien
Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich
Veterinary Laboratories Agency (Weybridge), New Haw, Addlestone, Surrey, Großbritannien
Veterinary Research Institute, Brno, Tschechische Republik
Veterquimica Ltda, Santiago, Chile
VIDO, Saskatoon, Kanada
Wageningen University, Department of Animal Sciences, Niederlande
Wellcome Trust Ctr. Human Genetics, Vaccinology, Oxford, Großbritannien
WHO Collaborating Centre for the Characterization of Rabies and Rabies-related Viruses, Veterinary Laboratories Agency, Department of Virology, New Haw, Großbritannien
WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Department of Microbiology and Immunology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA
WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Rabies Section, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Viral and Rickettsial Zoonoses Branch, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Institut Pasteur, Rabies Unit, Paris, Frankreich
WHO Collaborating Centre for Rabies Control, Pathogenesis and Epidemiology in Carnivores, Animal Diseases Research Institute (ADRI), Rabies Unit, Nepean, Ontario, Kanada
Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin (FiWi), Bern, Schweiz

Vorlesungs- und Hochschultätigkeit

PD Dr. M. **Beer**, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Wahlpflichtfach: „Übungen zur Biologie“ und „Diagnostik von Tierseuchenerregern“ und „Moderne Vakzinestrategien in der Veterinärmedizin“. – Dr. A. **Berndt**, Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie. Praktikum: „Grundlagen der Biologie für Biochemiker“. – PD Dr. F.J. **Conraths**, Privatdozent an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin. Vorlesung: „Angewandte Infektionsepidemiologie“; Gastvorlesungen an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, der Freien Universität Berlin und der Justus-Liebig-Universität Gießen. – Dr. L. **Geue**, Gastvorlesung an der Universität Leipzig. – Dr. H. **Granzow**, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Vorlesung: „Allgemeine Virologie“, „Ultrastruktur und Morphogenesestadien von Viren“. – Prof. Dr. M.H. **Groschup**, apl. Professor an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Vorlesungen: „Allgemeine Medizinische Mikrobiologie“ im Studiengang Biologie und „Querschnittsfach Lebensmittel“ im Studiengang Tiermedizin; fünftägiger praktischer Workshop am FLI „Immunologische und immunhistochemische Nachweisverfahren für Prionen“. – PD Dr. C. **Grund**, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Wahlpflichtfach: Taubenerkrankungen. – PD Dr. T. **Harder**, Uniklinikum Schleswig-Holstein, Institut für Infektionsmedizin, Beteiligung an Hauptvorlesung für Humanmediziner, Mikrobiologisches Praktikum für Zahnmediziner, Infektiologisches Seminar für

Biochemiker. – Dr. V. **Kaden**, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin. Vorlesung: „Allgemeine und Spezielle Virologie"; Universität Rostock. Vorlesung: „Impfstoffe". – PD Dr. M. **Knittler**, Privatdozent an der Universität zu Köln, Institut für Genetik. Vorlesungen: Genetik-Hauptvorlesung, Teil: Immunologie; Seminar „Immunbiochemie Seminar für Grund- und Hauptstudium" sowie begleitende Anleitung zu wissenschaftlichen Arbeiten. – Dr. M. **Kramer**, Gastvorlesung an der Universität Leipzig; Mitwirkung als Dozent an den Kursen für Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Kurs „Tierseuchen-/Tierkrankheiten-Monitoring am Beispiel aktueller Tierseuchen". – Prof. Dr. E. **Liebler-Tenorio**, apl. Professorin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Übungen: „Obduktionen". – Prof. Dr. T.C. **Mettenleiter**, apl. Professor an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Vorlesung: „Allgemeine Virologie" und „Molekulare Virologie", Literaturkolloquium Virologie. – Prof. Dr. G. **Meyers**, apl. Professor an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Vorlesung: „Einführung in die Virologie" und „Aktuelle Probleme der Virologie" sowie begleitende Praktika und Großpraktika. – PD Dr. I. **Moser**, Privatdozentin an der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim. Vorlesungen (Masterstudiengang): „Animal Hygiene in the Tropics and Subtropics", „Tierkrankheiten und Tiergesundheitslehre". – Dr. T. **Müller**, Gastvorlesungen an der Universität Potsdam. **–** PD Dr. H. **Neubauer**, Universität Leipzig. Vorlesung: „Gefährdungspotential exotischer Zoonosen für Mensch und Tier I und Gefährdungspotential exotischer Zoonosen für Mensch und Tier II. – Prof. Dr. E. **Pfaff**, apl. Professor an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Vorlesung: „Einführung in die Virologie" und „Aktuelle Probleme der Virologie" sowie begleitende Praktika und Großpraktika. – Prof. Dr. O. **Planz**, apl. Professor an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Vorlesung: „Aktuelle Probleme der Virologie" sowie begleitende Praktika und Großpraktika. – PD Dr. Dr. P. **Reinhold**, PhD, Privatdozentin an der Freien Universität Berlin. Vorlesungen: „Physiologie der Atmung, Pathophysiologie & Respiratorische Funktionsdiagnostik"; Lehrgespräche; Physiologisches Praktikum. – Dr. H.-J. **Rziha**, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Vorlesung: „Einführung in die Virologie" und „Aktuelle Probleme der Virologie" sowie begleitende Praktika und Großpraktika. – PD Dr. T. **Selhorst**, Privatdozent an der Universität Bonn. Seminar: „Leistungsphysiologie und Epidemiologie"; Bonner Biomathematisches Kolloquium, Landwirtschaftliche Fakultät, Bonn. **–** PD Dr. J. **Süss**, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Medizinische Fakultät. Vorlesungen: „Medizinische Virologie für Biologen", „Flaviviren". – Dr. C. **Staubach**, Mitwirkung als Dozent an den Kursen für Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Kurs „Tierseuchen-/Tierkrankheiten-Monitoring am Beispiel aktueller Tierseuchen". – Prof. Dr. L. **Stitz**, apl. Professor an der Justus-Liebig-Universität Gießen und Lehrauftrag an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Vorlesung: „Einführung in die Virologie" und „Pathobiologie viraler Infektionskrankheiten: Molekularbiologische und immunologische Grundlagen"; Seminar: „Pathomechanismen, Immunologie und Bekämpfung viraler Infektionskrankheiten"; Praktikum: „Molekulare Virologie". – Prof. Dr. J.P. **Teifke**, apl. Professor an der Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Veterinärpathologie. Vorlesung: „Allgemeine und Spezielle Pathologie der Haustiere", Repetitorium Pathologie. – Dr. J. **Teuffert**, Mitwirkung als Dozent an den Kursen für Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Kurs „Tierseuchen-/ Tierkrankheiten-Monitoring am Beispiel aktueller Tierseuchen". – PD Dr. Dr. Th. W. **Vahlenkamp**, Freie Universität Berlin. Vorlesungen im Rahmen Allgemeine und Spezielle Virologie, Immunologie und Immunopathologie; Adjunct Assistant Professor Dept. of Population Health and Pathobiology, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, USA.

Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Gremien

PD Dr. M. **Beer** ist Themeleader des EU Network of Excellence for Epizootic Disease Diagnosis and Control (EPIZONE). – PD Dr. F.J. **Conraths** war Vorsitzender des Verwaltungsausschusses der COST-Aktion 854. – Dr. L. **Geue** ist stellvertretender Vorsitzender der Tierversuchskommission beim Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Raumordnung des Landes Brandenburg. – Dr. U. **Fischer** ist Mitglied der Working Group for Veterinary Immunology und der Working Group for Developmental and Comparative Immunology der German Society for Immunology sowie stellvertretender Vorsitzender der Tierversuchskommission des Landes Mecklenburg-Vorpommern. – PD Dr. C. **Grund** ist Mitglied im EFSA-Expertengremium „Newcastle Disease and OIE ad hoc group on Newcastle Disease surveillance. – Dr. B. **Haas** ist Mitglied der Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. – Dr. M. **Heller** ist Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Arbeitskreis Veterinärimmunologie und stellvertretendes Mitglied der Tierschutzkommission nach § 15 TSchG in Thüringen. – Dr. H. **Hotzel** ist Mitglied der Arbeitsgruppe

„Molekulare diagnostische Verfahren“ des AVID und Mitglied in der § 64 LFGB-Arbeitsgruppe „Molekularbiologische Methoden Mikrobiologie“. – Dr. V. **Kaden** ist Mitglied des Ausschusses für Desinfektion in der Veterinärmedizin der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), des Arbeitskreises Tierische Produktion des Rates für Agrarwissenschaften Mecklenburg-Vorpommern und des Fachbeirates für Schweinezucht der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern sowie Mitglied des Wissenschaftlichen Beirats der Zeitschrift Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (JVL). – Dr. G. **Keil** ist Editor der Archives of Virology und Projektgutachter bei der Third World Academy of Science, der United States-Israel Binational Science Foundation und des Schweizerischen Nationalfonds. – Dr. H. **Köhler** ist Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Arbeitskreis Veterinärimmunologie und Mitglied der Tierschutzkommission nach § 15 TSchG in Thüringen. – Dr. M. **Kramer** ist Mitglied in der Arbeitsgruppe „GBR Up-date Methodology“ der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), Brüssel/Parma. – Prof. Dr. T.C. **Mettenleiter** ist Präsident des Senats der Bundesforschungsanstalten, Vorsitzender des wissenschaftlichen Beirats des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf, Mitglied im Editorial Board des Journal of General Virology sowie Mitglied des Vorstandes der Gesellschaft für Virologie, des wissenschaftlichen Beirats des Paul-Ehrlich-Instituts, Langen, und der Akademie der Naturforscher „Leopoldina“. – Dr. Th. **Müller** ist Mitglied des Technical Advisory Board der Alliance for Rabies Control und des Steering and Scientific Committee der OIE/WHO/EU Conference „Towards Rabies Elimination in Eurasia“ 2007 in Paris. – Dr. W. **Müller** ist Gutachter der AKS Hannover. – Dr. A. **Raßbach** ist Gutachterin der AKS Hannover. – PD Dr. H. **Neubauer** ist stellvertretender Vorsitzender der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie der DVG und Leiter der Arbeitsgruppe 5 der COST-Aktion 845 „Brucellose bei Tier und Mensch“. – PD Dr. Dr. P. **Reinhold** ist Europäischer Sekretär der „Veterinary & Comparative Respiratory Society“ (VCRS), Leiterin des Arbeitskreises „Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG); Mitglied des wissenschaftlichen Beirates der Sektion "Pathophysiologie und Aerosolmedizin" der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DPG) und Mitarbeiterin der ERS Task Force „Exhaled biomarkers" sowie Mitglied des Editorial Board der Zeitschrift Journal of Breath Research. – Dr. K. **Sachse** ist Vorsitzender des Verwaltungsausschusses der europäischen COST-Aktion 855 "Animal Chlamydioses and the Zoonotic Implications", Mitglied des Editorial Board der Zeitschriften Veterinary Microbiology, The Veterinary Journal und Veterinary Research Communications, Mitglied des Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes of the International Committee of Systematic Bacteriology (ICSB), Leiter des Working Team on Ruminant Mycoplasmas of the International Research Programme on Comparative Mycoplasmology (IRPCM). – Dr. C. **Staubach** ist Mitglied des Vorstandes der Arbeitsgruppe „Räumliche Statistik“ der deutschen Region der Internationalen Biometrischen Gesellschaft. – PD Dr. J. **Süss** ist Mitglied des Fachbeirates Forum Impfen; Mitglied der Akademie für Gemeinnützige Wissenschaften zu Erfurt; Mitglied der International Study Working Group on TBE. – Prof. Dr. L. **Stitz** ist wissenschaftliches Mitglied im Organisationsstab der Stabstelle Ernährungssicherheit des Landes Baden-Württemberg beim Regierungspräsidium Tübingen und Mitglied der Tierschutzkommission beim Regierungspräsidium Tübingen. – Prof. Dr. J.P. **Teifke** ist Mitglied der DVG Fachgruppe Pathologie, der European Society of Veterinary Pathology, der Internationalen Akademie für Pathologie (I.A.P.), der American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD) und Diplomate des American College of Veterinary Pathology (ACVP). – PD Dr. Dr. Th. W. **Vahlenkamp** ist Mitglied im Editorial Board „Veterinary Immunology and Immunopathology“, „Clinical and Vaccine Immunology“ und „Virus Genes“ sowie Vorsitzender des feline Component innerhalb des Veterinary Immunology Committee (VIC).

Ämter in berufsständischen Organisationen

Dr. D. **Beier** war Vizepräsidentin der Landestierärztekammer Brandenburg und ist Vorsitzende des Ausschusses für Weiterbildung in der Bundestierärztekammer und der Landestierärztekammer Brandenburg. – Dr. S.M. **Bergmann** ist Schatzmeister der European Association of Fish Pathologists. – Dr. D. **Fichtner** ist stellvertretender Vorsitzender des Ausschusses für Fische der Bundestierärztekammer. –Dr. E. **Lange** ist Mitglied der Unfallkasse des Bundes Berlin, Fachgruppe Landwirtschaft. – PD Dr. Dr. T. W. **Vahlenkamp** ist Vorstandsmitglied der Landestierärztekammer Mecklenburg-Vorpommern.

VIII. VERÖFFENTLICHUNGEN

1 Veröffentlichungen des Friedrich-Loeffler-Instituts

1.1 Jahresbericht 2005 des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

1.2 Tiergesundheitsjahresbericht 2005 des Friedrich-Loeffler-Instituts, 6. Jahrgang, 2006

1.3 Rabies Bulletin Europe, Vol. 29, No. 3 und 4, 2005; Vol. 30, No. 1 und 2, 2006

Herausgeber: Pötzsch, C.J. (Vol. 29 No. 3); Freuling, C. und Müller, Th. (Vol. 29 No. 4 und Vol. 30 No. 1 und 2)

2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

2.1 Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften

Abel, J., Schares, G., Orzeszko, K., Gasser, R.B. und J.T. Ellis. 2006. *Hammondia* isolated from dogs and foxes are genetically distinct. Parasitology **132:** 187-192.

Al Dahouk, S., K. Nockler, H.C. Scholz, H. Tomaso, R. Bogumil und H. Neubauer. 2006. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of Brucella infections. J. Immunol. Methods **309**:34-47.

Al Dahouk, S., T. Schneider, A. Jansen, K. Nockler, H. Tomaso, R.M. Hagen, H.C. Scholz, M. Rudwaleit, H. Neubauer und A.J. Morguet. 2006. *Brucella endocarditis* in prosthetic valves. Can. J. Cardiol. **22**:971-974.

Amselgruber, W.M., M. Büttner, T. Schlegel, M. Schweiger und E. Pfaff. 2006. The normal cellular prion protein (PrP(c)) is strongly expressed in bovine endocrine pancreas. Histochem. Cell Biol. **125:**441-8.

Amselgruber, W.M., M. Steffl, A. Didier, E. Martlbauer, E. Pfaff und M. Büttner. 2006. Prion protein expression in bovine podocytes and extraglomerular mesangial cells. Cell Tissue Res. **324:**497-505.

Ankermann, T., A. Reisner, T. Wiemann, H. Köhler, M. Krams und M.F. Krause. 2006. Intrapulmonary application of a 5-lipoxygenase inhibitor using surfactant as a carrier reduces lung edema in a piglet model of airway lavage. Pediatric Pulmonol. **41**:452-462.

Appel, T.R., R. Lucassen, M.H. Groschup, M. Joncic, M. Beekes und D. Riesner. 2006. Acid inactivation of prions: efficient at elevated temperature or high acid concentration. J. Gen. Virol. **87:**1385-1394.

Arnold, T, H. Neubauer, M. Ganter, K. Nikolaou, U. Roesler, U. Truyen und A. Hensel. 2006. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Goat Herds from Northern Germany. J. Vet. Med. B **53**:382-386.

Arricau-Bouvery, N., Y. Hauck, A. Bejaoui, D. Frangoulidis, C.C. Bodier, A. Souriau, H. Meyer, H. Neubauer, A. Rodolakis und G. Vergnaud. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. BMC Microbiol. **6**:38-51.

Bartels, C.J.M., F.J. Conraths, G. Schares, C. Björkman, J. Frössling, C. Van Maanen, W. Wouda, A. Fernández-García und L.M. Ortega-Mora. 2006. Supranational comparison of seroprevalences for *Neospora caninum* in cattle for representative regions of Germany, the Netherlands, Spain and Sweden.Vet. Parasitol. **137:**17-27.

Beer, M., G. Poll, G. Wolf und O.-R. Kaaden. 2006. A versatile flow cytometry based immunofluorescence inhibition assay for the detection of bovine viral diarrhea virus-specific antibodies. Dtsch. tierärztl. Wschr. **113:**121-168.

Berndt, A., J. Pieper und U. Methner. 2006. Circulating gamma delta T cells in response to *Salmonella* enterica serovar enteritidis exposure in chickens. Infect. Immun. 74:3967-3978.

Björkman, C., G. Alvarez-Garcia, F.J. Conraths, J.G. Mattsson, L.M. Ortega-Mora, H. Sager und G. Schares. 2006. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison.Vet. Parasitol. **140:**273-280.

Böttcher, S., B.G. Klupp, H. Granzow, W. Fuchs, K. Michael und T.C. Mettenleiter. 2006. Identification of a 709-amino-acid internal nonessential region within the essential conserved tegument protein (p)UL36 of pseudorabies virus. J. Virol. **80:**9910-9915.

Borrmann, E., F. Schulze, K. Cussler, I. Hänel und R. Diller. 2006. Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination-induced antibodies in rabbit sera against *Clostridium perfringens* epsilon toxin and Clostridium novyi alpha toxin. Vet. Microbiol. **114**:41-50.

Brauer, A., E. Lange und V. Kaden. 2006. Oral immunisation of wild boar against classical swine fever: uptake studies of new baits and investigations on the stability of lyophilised C-strain vaccine. Eur. J. Wildl. Res. **52:**271-276.

Brocchi, E., I.E. Bergmann, A. Dekker, D.J. Paton, D.J. Sammin, M. Greiner, S. Grazioli, F. de Simone, H. Yadin, B. Haas, N. Bulut, V. Malirat, E. Neitzert, N. Goris, S. Parida, K. Sorensen und K. de Clercq. 2006. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. Vaccine **24:**6966-6977.

Buschmann, A., A. Gretzschel, A.G. Biacabe, K. Schiebel, C. Corona, C. Hoffmann, M. Eiden, T. Baron, C. Casalone und M.H. Groschup. 2006. Atypical BSE in Germany – Proof of transmissibility and biochemical characterization. Vet. Microbiol. **117:**103-116.

Cano, L., P. Ferro, M.C. Alonso, S.M. Bergmann, A. Römer-Oberdörfer, E. Garcia-Rosado, D. Castro und J.J. Borrego. 2006. Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus in different marine fish species. J. Appl. Microbiol. **102(1):**32-40.

Clauss, M., C. Sauter-Louis, E. Chaher, C. Pottgiesser, S. Goebel, T. Selhorst, H.E. Wichmann, W. Klee und E. Kienzle. 2006. Investigations of the potential risk factors associated with cases of bovine spongiform encephalopathy in Bavaria, Germany. Vet Rec. **158:**509-513.

Conraths, F.J., L. Geue und H. Köhler. 2006. Ansätze zur Bekämpfung der Paratuberkulose beim Rind. Sonderausgabe Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr., 114**.**

Conraths, F.J. und G. Schares. 2006. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. Vet. Parasitol. **136:**91-98.

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

Damann, N., R. Klopfleisch, M. Rothermel, J.F. Doerner, T.C. Mettenleiter, H. Hatt und C.H. Wetzel. 2006. Neuronal pathways of viral invasion in mice after intranasal inoculation of pseudorabies virus PrV-9112C2 expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B. J. Neurovirol. **12:**60-64.

Damann, N., M. Rothermel, B.G. Klupp, T.C. Mettenleiter, H. Hatt und C.H. Wetzel. 2006. Chemosensory properties of murine nasal and cutaneous trigeminal neurons identified by viral tracing. BMC Neurosci. **7:**46.

Depner, K., C. Bunzenthal, B. Heun-Münch, G. Strebelow, B. Hoffmann und M. Beer. 2006. Diagnostic evaluation of a real-time RT-PCR assay for routine diagnosis of classical swine fever in wild boar. J. Vet. Med. B **53:**317-320.

Depner, K.R., G. Strebelow, C. Staubach, M. Kramer, J. Teuffert, L. Böttcher, B. Hoffmann, M. Beer, I. Greiser-Wilke und T. Mettenleiter. 2006. Case report – The significance of genotyping for the epidemiological tracing of classical swine fever (CSF). – Dtsch. Tierärztl. Wschr. **113:**159-162.

Depner, K.R., M. Ziller und C. Staubach. 2006. A Simple Statistical Approach for Assessing Inter-laboratory Comparison Tests for Classical Swine Fever Diagnosis. J. Vet. Med B **53**: 473-476.

De Regge, N., H.J. Nauwynck, K. Geenen, C. Krummenacher, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, T.C. Mettenleiter und H.W. Favoreel. 2006. Alpha-herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites. J. Cell Biol. **174:**267-275.

Didier, A., R. Dietrich, M. Steffl, M. Gareis, M.H. Groschup, S. Müller-Hellwig, E. Martlbauer und W.M. Amselgruber. 2006. Cellular prion protein in the bovine mammary gland is selectively expressed in active lactocytes. J. Histochem. Cytochem. **54:**1255-1261.

Dijkstra, J.M., T. Somamoto, L. Moore, I. Hordvik, M. Ototake und U. Fischer. 2006. Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. Mol. Immunol. Feb **43(5):**410-19

Döpfer, D., L. Geue, J. de Bree und M.C. de Jong. 2006. Dynamics of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from German beef cattle between birth and slaughter. Prev. Vet. Med. **73:** 229-240.

Dory, D., T. Fischer, V. Beven, R. Cariolet, H.-J. Rziha und A. Jestin. 2006. Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against Pseudorabies virus (Herpes suid 1). Vaccine **24**:6256-6263.

Dubey, J.P. und G. Schares. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. Vet. Parasitol. **140:**1-34.

Ehricht, R., P. Slickers, S. Goellner, H. Hotzel und K. Sachse. 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. Mol. Cell. Probes **20**:60-63.

Eiden, M., G.J. Palm, W. Hinrichs, U. Matthey, R. Zahn und M.H. Groschup. 2006. Synergistic and strain-specific effects of bovine spongiform encephalopathy and scrapie prions in the cell-free conversion of recombinant prion protein. J. Gen. Virol. **87:**3753-3761.

Essbauer, S., J. Schmidt, F.J. Conraths, R. Friedrich, J. Koch, W. Hautmann, M. Pfeffer, R. Wölfel, J. Finke, G. Dobler und R. Ulrich. 2006. A new Puumala hantavirus genotype as cause of an Nephropathia epidemica outbreak in South-East Germany in 2004. Epidemiol. Infect. **134:**1333-1344.

Ferris, N.P., D.P. King, S.M. Reid, G.H. Hutchings, A.E. Shaw, D.J. Paton, N. Goris, B. Haas, B. Hoffmann, E. Brocchi, M. Bugnetti, A. Dekker und K. de Clercq. 2006. Foot-and-mouth disease virus: A first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods. Vet. Microbiol. **117:**130-140.

Fischer, U., K. Utke, T. Somamoto, B. Köllner, M. Ototake und T. Nakanishi. 2006. Cytotoxic activities of fish leukocytes. Fish Shellfish Immunol. **20(2):**209-26

Fuchs, W., H. Granzow, R. Klopfleisch, B.G. Klupp und T.C. Mettenleiter. 2006. The UL4 gene of pseudorabies virus encodes a minor infected-cell protein that is dispensable for virus replication. J. Gen. Virol. **87:**2517-25.

Fuchs, W., J. Veits und T.C. Mettenleiter. 2006. Rekombinante Geflügelviren als Vektorimpfstoffe gegen Geflügelpest. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **119:**160-166.

Gall, A. und H. Schirrmeier. 2006. Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus genome in vaccinated rabbits after experimental infection. J. Vet. Med. B **53:**358-362.

Gedvilaite, A., E. Aleksaite, J. Staniulis, R. Ulrich und K. Sasnauskas. 2006. Size and position of truncations in the carboxy-terminal region of major capsid protein VP1 of hamster polyomavirus expressed in yeast determine its assembly capacity. Arch. Virol. **151:**1811-1825.

Gedvilaite, A., D.C. Dorn, K. Sasnauskas, G. Pecher, A. Bulavaite, R. Lawatscheck, J. Staniulis, T. Dalianis, T. Ramqvist, G. Schonrich, M.J. Raftery und R. Ulrich. 2006. Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. Virology **354:**252-260.

Gerner, W., M.S. Denyer, H.H. Takamatsu, T.E. Wileman, K.H. Wiesmüller, E. Pfaff und A. Saalmüller. 2006. Identification of novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitopes in c/c and d/d haplotype miniature swine. Virus Res. **121:**223-8.

Geue, L., T. Selhorst, C. Schnick, B. Mintel und F.J. Conraths. 2006. Analysis of the clonal relationship of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) of serogroup O165:H25 isolated from cattle. Appl. Environ. Microbiol. **72:**2254-2259.

Globig, A., E. Starick und O. Werner. 2006. Influenzavirus-Infektionen bei migrierenden Wasservögeln: Ergebnisse einer zweijährigen Studie in Deutschland. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **119:**132-139.

Goellner, S., E. Schubert, E. Liebler-Tenorio, H. Hotzel, H.P. Saluz und K. Sachse. 2006. Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different in vitro models of persistent infection. Infect. Immun. **74**:4801-4808.

Gretzschel, A., A. Buschmann, J. Langeveld und M.H. Groschup. 2006. Immunological characterization of abnormal prion protein from atypical scrapie cases in sheep using a panel of monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. **87:**3715-3722.

Grummer, B., S. Fischer, K. Depner, R. Riebe, S. Blome und I. Greiser-Wilke. 2006. Replication of classical swine fever virus strains and isolates in different porcine cell lines. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **113(4):**138-141.

Hänel, I., E. Borrmann, J. Müller und T. Alter. 2007. Relationships between bacterial genotypes and *in vitro* virulence properties of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from turkeys. J. Appl. Microbiol. **102:**433-441.

Heindl, P., A.F. Garcia, P. Butz, E. Pfaff und B. Tauscher. 2006. Protein conformation determines the sensibility to high pressure treatment of infectious scrapie prions. Biochim. Biophys. Acta **1764:**552-7.

Henning, K., S. Greiner-Fischer, H. Hotzel, M Ebsen und D. Theegarten. 2006. Isolation of Spiroplasma sp. from an Ixodes tick. Int. J. Med. Microbiol. **296**, Suppl 40:157-161.

Hlinak, A., U.R. Mühle, O. Werner, A. Globig, E. Starick, H. Schirrmeier, B. Hoffmann, A. Engelhardt, D. Hübner, F.J. Conraths, D. Wallschläger, H. Kruckenberg und T. Müller. 2006. A virological survey in migrating waders and other waterfowl in one of the most important resting sites of Germany. J. Vet. Med. B **53:** 105–110.

Hoffmann, B., K. Depner, H. Schirrmeier und M. Beer. 2006. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J. Virol. Methods **136:**200-209.

Jung, D., J.P. Teifke, A. Karger, K. Michael, S. Venz, W. Wittmann, K. Kindermann, K. Nockler, E. Mundt. 2006. Evaluation of baculovirus-derived recombinant 53-kDa protein of Trichinella spiralis for detection of Trichinella-specific antibodies in domestic pigs by ELISA. Parasitol. Res. **100:**429-437.

Kaden, V., M. Kramer, B. Kern, A. Hlinak, L. Mewes, A. Hänel, Ch. Renner, J. Dedek und W. Bruer. 2006. Diagnostic procedure after completion of oral immunisation against classical swine fever in wild boar. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. **25:**989-997.

Kaden, V., E. Lange, T. Müller, J. Teuffert, J.P. Teifke und R. Riebe. 2006. Protection of Gruntlings against Classical Swine Fever Virus-Infection after Oral Vaccination of Sows with C-strain Vaccine. J. Vet. Med. B **53:**455-460.

Kauffold, J., F. Melzer, A. Berndt, G. Hoffmann, H. Hotzel und K. Sachse. 2006. Chlamydiae in oviducts and uteri of repeat breeder pigs. Theriogenology **66**:1816-1823.

Kauffold, F., K. Melzer, K. Henning, C. Schulze, K. Leiding und K. Sachse. 2006. Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination. Theriogenology **65:**1750-1758.

Kemper, N., A. Aschfalk und C. Höller. 2006. Campylobacter spp., Enterococcus spp., Escherichia coli, Salmonella spp., Yersinia spp., and Cryptosporidium oocysts in semi-domesticated reindeer (Rangifer tarandus tarandus) in Northern Finland and Norway. Acta Vet Scand. **48:**7

Keusekotten, K., R.M. Leonhardt, S. Ehses und M.R. Knittler. 2006. Biogenesis of functional antigenic peptide transporter TAP requires assembly of pre-existing TAP1 with newly synthesized TAP2. J. Biol. Chem. **281:**17545-17551.

Klein, C., H.J. Smith und P. Reinhold. 2006. The use of impulse oscillometry for separate analysis of inspiratory and expiratory impedance parameters in horses: Effects of sedation with xylazine. Res. Vet. Sci. **80**:201-208.

Klempa, B., F. Meisel, D.H. Krüger, R. Ulrich, M. Stanko und M. Labuda. 2006. Saaremaa hantavirus should not be confused with its dangerous relative, Dobrava virus – Reply. J. Clin. Microbiol. **44:**1609-1611.

Klopfleisch, R., D. Beier und J.P. Teifke. 2006. Choroid Plexus Carcinoma in a Goat. J. Comp. Path. **135:** 42-46.

Klopfleisch, R., B.G. Klupp, W. Fuchs, M. Kopp, J.P. Teifke und T.C. Mettenleiter. 2006. Influence of pseudorabies virus proteins on neuroinvasion and neurovirulence in mice. J. Virol. **80(11):**5571-6.

Klopfleisch, R., O. Werner, E. Mundt, T. Harder und J.P. Teifke. 2006. Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (Columbia livia f. domestica). Vet. Pathol. **43(4):**463-70.

Klupp, B.G., H. Granzow, G. Keil und T.C. Mettenleiter. 2006. The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. J. Virol. **80:**6235-6246.

Kreier, F., Y.S. Kap, T.C. Mettenleiter, C. van Heijningen, J. van der Vliet, A. Kalsbeek, H.P. Sauerwein, E. Fliers, J.A. Romijn und R.M. Buijs. 2006. Tracing from fat tissue, liver, and pancreas: a neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. Endocrinology **147:**1140-1147.

Kroschewski, K., M. Kramer, A. Micklich, C. Staubach, R. Carmanns und F.J. Conraths. 2006. Animal disease outbreak control, response & crisis management – What we can/should do now? Rev. Sci. Techn. Off. Int. Epizoot. **25:**211-221.

Kunze, U., U. Baumhackl, R. Bretschneider, V. Chmelik, B. Grubeck-Loebenstein, M. Haglund, F. Heinz, R. Kaiser, P. Kimmig, Ch. Kunz, M. Kunze, A. Mikiene, L. Misic-Majerus, S. Randolph, B. Rieke, P. Stefanoff, J. Süss und R. Wimmer. 2006. Tick-borne encephalitis in the golden agers: A conference report of the International Scientific Working Group on Tick-borne Encephalitis (ISW TBE). Vaccine **24**:1236-1237.

Le Fleche, P., I. Jacques, M. Grayon, S. Al Dahouk, P. Bouchon, F. Denoeud, K. Nöckler, H. Neubauer, L.A. Guilloteau und G. Vergnaud. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. BMC Microbiol. **6**:9-22.

Leliveld, S.R., R.T. Dame, G.J.L. Wuite, L. Stitz und C. Korth. 2006. The expanded octarepeat domain selectively binds prions and disrupts homomeric prion protein interactions. J. Biol. Chem. **281:**3268-3275.

Liebler-Tenorio, E.M. und R. Pabst. 2006. MALT structure and function in farm animals. Vet. Res. **37**:257-280.

Liebler-Tenorio, E.M., S. Kenklies, I. Greiser-Wilke, B. Makoschey und J.F. Pohlenz. 2006. Incidence of BVDV1 and BVDV2 Infections in Cattle Submitted for Necropsy in Northern Germany. J. Vet. Med. B **53**:363-369.

Liu, P.H., L. Hudson, M.B. Tompkins, T.W. Vahlenkamp, B. Colby, C. Rundle und R.B. Meeker. 2006. Cerebrospinal fluid is an efficient route for establishing brain infection with feline immunodeficiency virus and transfering infectious virus to the periphery. J. Neurovirol. **12:**294-306.

Liu, P.H., L. Hudson, M.B. Tompkins, T.W. Vahlenkamp and R.B. Meeker. 2006. Compartmentalization and evolution of feline immunodeficiency virus between the central nervous system and periphery following intracerebroventricular or systemic inoculation. J. Neurovirol. **12:**307-321.

Ludwig, S., S. Pleschka, O. Planz und T. Wolff. 2006. Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells. Cell. Microbiol. **8:**375-386.

Lühken, G., H.R. Brandt, A. Buschmann, M.H. Groschup und G. Erhardt. 2006. Microsatellite CTSBJ12 is located distal to the ovine prion protein gene on OAR13 and is not associated with scrapie susceptibility. Anim. Gen. **37:**426-427.

McElhinney, L.M., D. Marston, N. Johnson, C. Black, O. Matouch, D. Lalosevic, S. Stankov, K. Must, M. Smreczak, J.F. Zmudzinski, A. Botvinkin, O. Aylan, E. Vanek, F. Cliquet, T. Müller und A.R. Fooks. 2006. Molecular Epidemiology of Rabies Viruses in Europe. Dev. Biol. **125:**17-28.

Merk, S., H. Meyer, I. Greiser-Wilke, L.D. Sprague und H. Neubauer. 2006. Detection of *Burkholderia cepacia* DNA from artificially infected EDTA-blood and lung tissue comparing different DNA isolation methods. J. Vet. Med. B **53**:281-285.

Methner, U., R. Diller, R. Reiche und K. Böhland. 2006. Zum Vorkommen von von Salmonellen bei Legehennen in unterschiedlichen Haltungsformen und Schlussfolgerungen für die Bekämpfung. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **119:**467-473.

Mettenleiter, T.C. 2006. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. Vet. Microbiol. **113(3-4):**163-169.

Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp und H. Granzow. 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. Curr. Opin. Microbiol. **9:**423-429.

Michael, K., S. Böttcher, B.G. Klupp, A. Karger und T.C. Mettenleiter. 2006. Pseudorabies virus particles lacking tegument proteins pUL11 or pUL16 incorporate less full-length pUL36 than wild-type virus, but specifically accumulate a pUL36 N-terminal fragment. J. Gen. Virol. **87:**3503-3507.

Michael, K., B.G. Klupp, T.C. Mettenleiter und A. Karger. 2006. Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E. J. Virol. **80:**1332-1339.

Möbius, P., P. Lentzsch, I. Moser, L. Naumann, G. Martin und H. Köhler. 2006. Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. Vet. Microbiol. **117**:284-291.

Monecke, S., P. Slickers, H. Hotzel, G. Richter-Huhn, M. Pohle, S. Weber, W. Witte und R. Ehricht. 2006. Microarray-based characterisation of a Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. **12**:718-728.

Müller, H., L. Stitz und D. Riesner. 2006. Risk assessment for fat derivatives in cases of contamination with BSE. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **108:**812-826.

Müller, J., F. Schulze, W. Müller und I. Hänel. 2006. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. Vet. Microbiol. **113**:123-129.

Müller, M., W. Breuer, K. Nitschke, G. Drost, A. Krisch, M. Schmid, K.-H. Bogner und D. Beier. 2006. Fallbericht: Mastzellenleukose bei einem neugeborenen Kalb. Dtsch. tierärztl. Wschr. **113**: 32-35.

Müller, T., T. Selhorst, J. Burow, A. Schameitat und A. Vos. 2006. Cross reactive antigenicity in orally vaccinated foxes and raccoon dogs against European Bat Lyssavirus Type 1 and 2. Dev. Biol. **125:**195-204.

Müller-Hellwig, S., M.H. Groschup, R. Pichner, M. Gareis, E. Martlbauer, S. Scherer und M.J. Loessner. 2006. Biochemical evidence for the proteolytic degradation of infectious prion protein PrPsc in hamster brain homogenates by foodborne bacteria. Syst. Appl. Microbiol. **29:**165-171.

Neill, J.D., E. Liebler-Tenorio und J.F. Ridpath. 2006. Global gene expression profiling of bovine immature B cells using serial analysis of gene expression. Anim. Biotechnol. 17:21-31.

Nunziante, M., C. Kehler, E. Maas, M.U. Kassack, M.H. Groschup und H.M. Schätzl. 2006. Charged bipolar suramin derivatives induce aggregation of the prion protein at the cell surface and inhibit PrP^{Sc} replication. J. Cell Sci. **118:**4959-4973.

Oliver, S.L., C.A. Batten, Y. Deng, M. Elschner, P. Otto, A. Charpilienne, I.N. Clarke, J.C. Bridger und P.R. Lambden. 2006. Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses. J. Clin. Microbiol. 44:992-998.

Otto, P., E.M. Liebler-Tenorio, M. Elschner, J. Reetz, U. Lohren und R. Diller. 2006. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). Avian Dis. 50:411-418.

Planz, O. 2006. Influenzaviren und intrazelluläre Signalwege. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **119:**101-111.

Pósfai, G., G. Plunkett, T. Fehér, D. Frisch, G.M. Keil, K. Umenhoffer, V. Kolisnychenko, B. Stahl, S.S. Sharma, M. de Arruda, V. Burland, S.W. Harcum und F.R. Blattner. 2006. Emergent Properties of Reduced-Genome *Escherichia coli*. Science **312:**1044-1046.

Pottgießer, C., D. Kämer, K. Teske, M. Kramer, M. Ziller, T. Selhorst und F.J. Conraths. 2006. Potential risk factors associated with BSE in cattle from Schleswig-Holstein, Germany. J. Vet. Med. B **53:**306-311.

Rang, A. H. Heider, R. Ulrich und D.H. Krüger. 2006. A novel method for cloning of non-cytolytic viruses. J. Virol. Meth. **135:**26-31.

Reinhold, P., J. Jaeger und C. Schroeder. 2006. Evaluation of methodological and biological influences on the collection and composition of exhaled breath condensate. Biomarkers **11**: 118-142.

Ridpath, J.F., S. Bendfeldt, J.D. Neill und E. Liebler-Tenorio. 2006. Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. Virus Res. **118**:62-69.

Römer-Oberdörfer, A., J. Veits, O. Werner und T. Mettenleiter. 2006. Enhancement of pathogenicity of Newcastle disease virus by alteration of specific amino acid residues in the surface glycoproteins F and HN. Avian Dis. **50:**259-263.

Sachse, K., H. Hotzel, P. Slickers und R. Ehricht. 2006. The use of DNA microarray technology for detection and genetic characterisation of chlamydiae. Dev. Biol. **126**:203-210, discussion 326-327.

Sager, H., Steiner Moret, C., Müller, N., Staubli, D., Esposito, M., Schares, G., Hässig, M., Stärk, K. und B. Gottstein. 2006. Incidence of Neospora caninum and other intestinal protozoan parasites in populations of Swiss dogs. Vet. Parasitol. **139:** 84-92.

Scheel, B., S. Aulwurm, J. Probst, L. Stitz, I. Hoerr, H.-G. Rammensee, M. Weller und S. Pascolo. 2006. Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA. Eur. J. Immunol. **36:**2807-2816.

Scherbl, C., R. Pichner, M.H. Groschup, S. Mueller-Hellwig, S. Scherer, R. Dietrich, E. Maertlbauer und M. Gareis. 2006. Degradation of scrapie associated prion protein (PrPSc) by the gastrointestinal microbiota of cattle. Vet. Res. **37:**695-703.

Schmidt, J., H. Meisel, S.G. Capria, R. Petraityte, A. Lundkvist, B. Hjelle, P.A. Vial, P. Padula, D.H. Krüger und R. Ulrich. 2006. Serological assays for the detection of human andes hantavirus infections based on its yeast-expressed nucleocapsid protein. Intervirology **49:**173-184.

Schmidtke, M., R. Zell, K. Bauer, A. Krumbholz, C. Schrader, J. Süss und P. Wutzler. 2006. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 Influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. Intervirology 49:286-293.

Scholz, H.C., M. Joseph, H. Tomaso, S. Al Dahouk, A.Witte, J. Kinne, R.M. Hagen, R. Wernery, U. Wernery und H. Neubauer. 2006. Detection of the re-emerging agent *Brukholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arabic Emirates by a newly developed *flip*-based PCR assay. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 54:241-247

Scholz, H.C., H. Tomaso, S. Al Dahouk, A. Witte, M. Schloter, P. Kampfer, E. Falsen und H. Neubauer. 2006. Genotyping of *Ochrobactrum anthropi* by recA-based comparative sequence, PCR-RFLP, and 16S rRNA gene analysis. 2006. FEMS Microbiol. Lett. 257:7-16.

Scholz, H.C., A. Witte, H. Tomaso, S. Al Dahouk und H. Neubauer. 2006. Detection of *Chromobacterium violaceum* by multiplex PCR targeting the prgI, spaO, invG, and sipB genes. Syst. Appl. Microbiol. 29:45-48.

Schütze, H., R. Ulferts, B. Schelle, S. Bayer, H. Granzow, B. Hoffmann, T.C. Mettenleiter und J. Ziebuhr. 2006. Characterization of White bream virus reveals a novel genetic cluster of nidoviruses. J. Virol. **80:**11598-11609.

Schulze, F., A. Bagon, W. Müller und H. Hotzel. 2006. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. J. Clin. Microbiol. **44**:2019-2024.

Selhorst, T., T. Müller und H.-J. Bätza. 2006. Epidemiological analysis of setbacks in the final stage of fox rabies elimination in densely populated areas in Germany. Dev. Biol. **125:**127-32.

Splettstösser, W., D. Hassler und H. Neubauer. 2006. Serie Infektionskrankheiten: Renaissance der Tularämie („Hasenpest"). Dt. Med. Wschr. **131:**132-134.

Stäubli, D., S. Nunez, H. Sager, G. Schares und B. Gottstein. 2006. *Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. Parasitol. Res. **99:**648-658.

Starick, E., O. Werner, H. Schirrmeier, B. Köllner, R. Riebe und E. Mundt. 2006. Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species. J. Vet. Med. B **53(8):**370-75.

Sting, R., E. Lerke, H. Hotzel, S. Jodas, C. Popp und H.M. Hafez. 2006. Comparative studies on detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* in meat turkey flocks using cell culture, ELISA, and PCR. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **113**:50-54.

Süss, J., C. Klaus, R. Diller, C. Schrader, N. Wohanka und U. Abel. 2006. TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. Int. J. Med. Microbiol. **296**, Suppl 40:63-68.

Tackmann, K., Mattis, R. Ziller, M. und F.J. Conraths. (2006). Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes: validation of a protocol of the intestinal scraping technique. J. Vet. Med. B **53:**395-398.

Tomaso, H., C. Bartling, S. Al Dahouk, R.M. Hagen, H.C. Scholz, W. Beyer und H. Neubauer. 2006. Growth characteristics of *Bacillus anthracis* compared to other *Bacillus* spp. on the selective nutrient media Anthrax Blood Agar® and Cereus Ident Agar®. Syst. Appl. Microbiol. **29**:24-28.

Tomaso, H., G. Mooseder, S. Al Dahouk, C. Bartling, H.C. Scholz, R. Strauss, T.M. Treu und H. Neubauer. 2006. Seroprevalence of anti-yersinia antibodies in healthy Austrians. Eur. J. Epidemiol. **21**:77-81.

Tomaso, H., H.C. Scholz, S. Al Dahouk, M. Eickhoff, T.M. Treu, R. Wernery, U. Wernery und H. Neubauer. 2006. Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting fliP for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. Clin. Chem. **52**:307-310.

Truyen, U. und M. Kramer. 2006. Die aktuelle Tierseuchensituation in den EU-Beitrittsländern. – Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr. **13:**169-177.

Utke, K., S. Bergmann, N. Lorenzen, B. Köllner, M. Ototake und U. Fischer. 2006. Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout. Oncorhynchus mykiss, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. Fish Shellfish Immunol. **22(3):**182-96.

Vahlenkamp, T.W. und T.C. Harder. 2006. Influenza virus infections in mammals. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **119:**123-131.

Veits, J., D. Wiesner, W. Fuchs, B. Hoffmann, H. Granzow, E. Starick, E. Mundt, H. Schirrmeier, T. Mebatsion, T.C. Mettenleiter und A. Römer-Oberdörfer. 2006. Newcastle disease virus expressing H5 gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **103:**8197-8202.

von Blumröder, D., R. Stambusch, R. Labohm, W. Klawonn, K. Dräger, W. Fasen, F.J. Conraths und G. Schares. 2006. Potentielle Risikofaktoren für den serologischen Nachweis von *Neospora caninum*-Infektionen in Rinderherden in Rheinland-Pfalz. Tierärztl. Praxis **34:**141-147.

Werner, O. 2006. Klassische Geflügelpest – Eine Übersicht. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **119:**140-150.

Werner, O. und T. Harder. 2006. Bekämpfungsstrategie bei Klassischer Geflügelpest in Deutschland und der Europäischen Union. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **119:**151-159.

Williams, P.H., W. Rabsch, U. Methner, W. Voigt, H. Tschäpe und R. Reissbrodt. 2006. Catecholate receptor proteins in *Salmonella enterica:* role in virulence and implications for vaccine development. Vaccine **24**:3840-3844.

Wittig, M.B., P. Wohlsein, R.M. Hagen, S. Al Dahouk, H. Tomaso, H.C. Scholz, K. Nikolaou, R. Wernery, U. Wernery, J. Kinne, M. Elschner und H. Neubauer. 2006. Glanders - a comprehensive review. Dtsch. Tierarztl. Wschr. **113**:323-330.

Zell, R., A. Krumbholz, M. Dauber, E. Hoey und P. Wutzler. 2006. Molecular-based reclassification of the bovine enteroviruses. J. Gen. Virol. **87:**375-385.

Zhang, F., M. Yu, E. Weiland, C. Morrissy, N. Zhang, H. Westbury und L.F. Wang. 2006. Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and E^{rns} using phage-displayed random peptide library. Arch. Virol. **151:**37-54.

Zielonka, A., A. Gedvilaite, R. Ulrich, D. Lüschow, K. Sasnauskas, H. Müller und R. Johne. 2006. Generation of virus-like particles consisting of the major capsid protein VP1 of goose hemorrhagic polyomavirus and their application in serological tests. Virus Res. **120:**128-137.

Zvirbliene, A., L. Samonskyte, A. Gedvilaite, T. Voronkova, R. Ulrich und K. Sasnauskas. 2006. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. J. Immunol. Methods **311:**57-70.

2.2 Kongressbeiträge und nicht referierte Veröffentlichungen

Benkö, M., G.L. Kajan, M. Janoska, E.R. Kovacs, J.F.X. Wellehan, P. Zsivanovits, R.E. Gough, S. Blahak, H. Schirrmeier, T. Bakonyi und B. Harrach. 2006. How to find „new“ adenoviruses (7th ESSV-Congress, 24.-27. September 2006, Lissabon, Tagungsband, S. 130).

Bergmann, S.M., J. Kempter, J. Sadowski und D. Fichtner. 2006. First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (Cyprinus carpio L.) in Poland. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. **26(2):**97-104.

Berndt, A., J. Pieper und U. Methner. 2006. Chicken immune cell response to different Salmonella serovars (International Symposium „Salmonella and Salmonellosis“, Saint-Malo, France 10-12 May 2006, 247-250).

Borrmann, E., I. Hänel, C. Muselmann, A. Hinsching und F. Schulze. 2006. Campylobacter jejuni-induced interleukin 8 response in human intestinal epithelial cells (Biospektrum. Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung Jena, 19.-22. März 2006, 123).

Böttcher, J. und H. Schirrmeier. 2006. Rückblick auf die „Jubiläums“-AVID-Tagung 2006, DVG-Forum 2/2006, 25-30.

Conraths, F.J. 2006. Aktueller Kenntnisstand (01.08.06) zu Infektionen mit Influenza A/H5N1 Asia („Vogelgrippe“). NABU Mitteilungsblatt der BAG Weißstorchschutz **98:** 14-15.

Conraths, F.J. 2006. Epidemiologie der Influenza A/H5N1 Asia und Beurteilung der Verbrauchergefährdung (Schriftenreihe des Instituts für Humanernährung und Lebensmittelkunde der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.Workshop "Produktqualität tierischer Lebensmittel". Kiel, 2006, S. 57-68)

Depner, K. 2006. Die klassische Schweinepest. Nutztierpraxis Aktuell 46-59.

Elschner, M. 2006. Glanders – a reemerging disease in horses (Proceedings of the 24th Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society, in cooperation with FLI and DVG, Jena, Germany, 08.-10. October 2006).

Fichtner, D. 2006. Vermehrung von H5N1-Influenzavirus in Fischen? Fischerei & Fischmarkt in M-V **6:**5-6.

Fichtner, D. und S.M. Bergmann. 2006. Die Koi-Herpesvirus-Infektion – Eine neue Fischseuche. Fischerei & Fischmarkt in M-V **6:**41-45.

Fichtner, D., S.M. Bergmann, M. Dauber, P.-J. Enzmann, H. Granzow, G. Kotterba, D. Schrudde und H. Schütze. 2006. Koi-Herpesvirus – wie groß ist die Gefahr für unsere einheimischen Fischbestände und welche vorbeugenden Maßnahmen sind denkbar (Fachtagung „Tierschutz in der Fischerei – Fischartenschutz", 21. Oktober 2006 in Jena, Angeln in Thüringen **4:**8).

Gierke, F. und H. Köhler. 2006. Einflussfaktoren auf die Sensitivität der Anzüchtung von Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis aus Rinderkot auf HEYM mit Mycobactin J (3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose, 10.-11. Oktober 2006, Jena, Tagungsband)

Goellner, S., E. Schubert, H.P. Saluz und K. Sachse. 2006. Persistent Chlamydophila psittaci infection induces upregulation of apoptosis inhibitors in the host cell (Proceedings of the 4th Annual Workshop of COST Action 855 "Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications", Edinburgh/UK, September 3-5, S. 40)

Goellner, S., E. Schubert, H.P. Saluz und K. Sachse. 2006. Molecular mechanisms involved in the persistent state of chlamydiae (Proceedings of the 24th Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society, in cooperation with FLI and DVG, Jena, Germany, 08.-10. October 2006, S. 72).

Gottschaldt, J. 2006. Differentiation of Mycobacteria by fatty acid profiles using gaschromatography – mass spectrometry. (Co-ordination Action SSPE-CT-2004-501903, Workshop WP4. Laboratory Diagnosis of Mycobacterium spp. 26.-29. April 2006, Jena, Abstractband, S. 36).

Günther, R., W. Haider, H. Hotzel und M. Ryll. 2006. Blepharoconjunctivitis in turkeys – the possible role of Bisgaard Taxon 14 (Proceedings of the 6th International Symposium on Turkey Diseases, Mai 2006, Berlin, Germany, S. 129-133)

Hänel, I., E. Borrmann, J. Müller und T. Alter. 2006. Molecular characterization and determination of virulence properties of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. Biospektrum (Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung, Jena, 19.-22. März 2006, S. 182-183).

Hafner, A., B. Haas, H. Voigt und M. Büttner. 2006. Bedeutende Virusinfektionen mit Haut- und Schleimhautmanifestation beim Schaf. Tierärztl. Praxis, Ausgabe Großtiere Nutztiere **33:**292-298.

Harder, T.C., O. Werner und A. Globig. 2006. Avian Influenza 2006, 48-86. http://www.influenzareport.com/ir/ai.htm

Henning, K., S. Greiner-Fischer, H. Hotzel, M. Ebsen und D. Theegarten. 2006. Isolation of Spiroplasma sp. from an Ixodes tick. International Journal of Medical Microbiology **296 S1 (Supplement 40):** 157-161.

Hotzel, H., K. Sachse, S. Joseph, M. Joseph und U. Wernery. 2006. Infections by Mycoplasma falconis and Mycoplasma buteonis-like mycoplasmas in hunting falcons in the United Arab Emirates. (Proceedings of the 16th International Congress of the International Organization for Mycoplasmology, Cambridge/UK, 9-14 July, S. 52).

Hruschka, K., P. Kielstein, H. Hotzel und H. Kielstein. 2006. Katzenkratzkrankheit, eine wenig bekannte Zoonose. Der Hausarzt **10:**63-66.

Jäger, J., K. Sachse, E. Schubert, E. Liebler-Tenorio, C. Schröder, N. Kirschvink und P. Reinhold. 2006. Airway obstruction and pulmonary inflammation in clinically latent respiratory infection with Chlamydiae in calves (Proceedings of the 24th Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society, in cooperation with FLI and DVG, Jena, Germany, 08.-10. October 2006, S. 74).

Kaiser, R. und J. Süss. 2006. Frühsommer-Meningoenzephalitis. Ärzteblatt Thüringen **17:**217-221.

Kempf, E., N. Borel, H. Hotzel, E. Schubert, P. Torgerson, R. Ehricht, A. Pospischil und K. Sachse. 2006. Examination of clinical samples using a DNA microarray assay for chlamydiae. (Proceedings of the 4th Annual Workshop of COST Action 855 "Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications", Edinburgh/UK, September 3-5, S. 16).

Klaus, C., P. Kimmig und J. Süss. 2006. Weitere durch Zecken übertragene Erkrankungen. Ärzteblatt Thüringen **17:**222-224.

Köhler, H. 2006. Erste Erfahrungen mit einem automatischen Flüssigkultursystem zum Nachweis von Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Kotproben von Rindern. (Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie", Justus-Liebig-Universität Giessen, 15.-17. Juni 2006, Tagungsband).

Köhler, H. und F. Gierke. 2006. Ist die Flüssigkultur die Methode der Wahl für die Anzüchtung von Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis aus Kotproben von Rindern? (3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose, Jena, 10. und 11. Oktober 2006, Tagungsband).

Köhler, H., F. Gierke und P. Möbius. 2006. Erregernachweiskonzepte zur Paratuberkulose-Sanierung. Sonderausgabe Amtstierärztl. Dienst u. Lebensmittelkontr., S. 115.

Köhler, H., F. Gierke und P. Möbius. 2006. Cultural detection of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in faecal samples of cattle using BD BACTEC MGIT Para TB Medium – Preliminary results of a pilot study. (Co-ordination Action SSPE-CT-2004-501903, Workshop WP4. Laboratory Diagnosis of Mycobacterium spp., Jena, 26.-29. April 2006, Abstractband, S. 12).

Köhler, H., B. Burkert, I. Pavlik, T. Selhorst und G. Martin. 2006. Evaluation of serological tests for the diagnosis of paratuberculosis – calculation of predictive values and sample size in monitoring programmes. (Co-ordination Action SSPE-CT-2004-501903, Workshop WP4. Laboratory Diagnosis of Mycobacterium spp., 26.-29. April 2006, Jena, Abstractband, S. 28-29).

Köhler, H., I. Moser, E. Borrmann, J. Gottschaldt und P. Möbius. 2006. Laboratory Diagnosis of Mycobacterium spp. (WP4 of VENoMYC. Abstractband. ISBN 103-00-019410-X).

Luy, J. und K. Depner. 2006. The need for a paradigm shift in the control of classical swine fever. EurSafe News **8:**4.

Melzer, F. und G. Schmoock. 2006. Application of molecular diagnostics to identify and differentiate Brucella spp. originated from human blood cultures. (Final Meeting of COST action 845, Silvi Marina, Italy, 27.-29. September 2006).

Melzer, F., H. Tomaso und H. Neubauer. 2006. Quality control of molecular tests and their recognition as validated diagnostics. (3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose, 10. und 11. Oktober 2006, Jena, Tagungsband).

Methner, U. 2006. Zur Methodik der bakteriologischen Untersuchung nach Rinder-Salmonellose-Verordnung. (Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie", Wetzlar, 15.-17. Juni 2006, S. 70).

Methner, U., A. Berndt und A. Haase. 2006. Exploitation of intestinal colonisation inhibition between *Salmonella* organisms in vaccines for poultry – potential and limitations –. (International Symposium „Salmonella and Salmonellosis“, Saint-Malo, France, 10-12 May 2006, S. 585-586).

Methner, U., H. Bocklisch, J. Plötner und M. Heller. 2006. *Salmonella* Choleraesuis bei Wildschweinen in Thüringen – pathomorphologische und epidemiologische Betrachtungen –. (Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, Wetzlar, 15.-17. Juni 2006, S. 15).

Mettenleiter, T.C. 2006. BSE-Pathogenesestudie und BSE-Situation in Deutschland. Nova Acta Leopold. **NF 94:**21-29.

Mettenleiter, T.C. 2006. Ressortforschung – eine Säule der deutschen Wissenschaft. Forschungsreport Ernährung, Landwirtschaft, Forsten, 24-25.

Mielke, B., H. Hotzel, C. Klaus und J. Süss. 2006. Hohes FSME-Risiko – Untersuchungen zur Prävalenz des Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSMEV) im Gemeinen Holzbock (*Ixodes ricinus*) in der nördlichen Magdeburger Umgebung. Ärzteblatt Sachsen-Anhalt **17**:15-16.

Möbius, P., J. Gottschaldt, H. Helbing, H. Hotzel, A. Raßbach und H. Köhler. 2006. Untersuchungen zum molekularbiologischen Nachweis von Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis beim Rind. (Tagungsbericht der 3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose, Jena, 10. und 11. Oktober 2006).

Möbius, P., H. Helbing, J. Gottschaldt, H. Hotzel, I. Moser und H. Köhler. 2006. Isolation of Map and atypical Mycobacteria from milk filters of dairy cow herds. (Abstracts of the 27th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, London, Great Britain, July 9-12, 2006).

Möbius, P., H. Hotzel, A. Raßbach und H. Köhler. 2006. What is the most suitable target region for amplification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: IS900, ISMAV2, F57 or Locus 255? (Abstracts of the 27th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, London, Great Britain, July 9-12, 2006).

Möbius, P., H. Hotzel, A. Raßbach und H. Köhler. 2006. Comparison of PCR assays targeting 4 different target regions for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. (Abstracts of the WP4. Laboratory Diagnosis of Mycobacterium spp. EU-Workshop. 26.-29. April 2006, Jena, Abstractband I.S.B.N.-10: 3-00-019410-X, 27).

Möbius, P., G. Luyven und H. Köhler. 2006. Das Vorkommen verschiedener Rinderstämme der Spezies Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Deutschland – genotypisiert mit RFLP und MIRU-PCR. (Tagung der DVG-Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, 15. -17. Juni 2006, Tagungsband).

Möbius, P., G. Luyven und H. Köhler. 2006. Die Charakterisierung von bovinen Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis – Isolaten aus verschiedenen Regionen Deutschlands mit Hilfe von IS900-DNA-Fingerprinting- und MIRU-PCR. (DVG Fachgruppentagung Epidemiologie und Dokumentation „Von der Überwachung zur Bekämpfung“- Methodische Aspekte der Kontrolle von Tierseuchen, Bern/Schweiz, 06. -08. September 2006, Tagungsband).

Molzen, B., D. Schrudde, D. Fichtner und S.M. Bergmann. 2006. Der Europäische Aal – neue Erkenntnisse und Erfordernisse. Teil 2: Das Aalherpesvirus (Herpesvirus anguillae, HVA). Auf Auf Heft **3:**12-13.

Molzen, B., D. Schrudde, D. Fichtner und S.M. Bergmann. 2006. Der Europäische Aal – neue Erkenntnisse und Erfordernisse. Teil 2: Das Aalherpesvirus (Herpesvirus anguillae, HVA). Aquakultur und Fischereiinformation, Baden-Württemberg, Heft **3:**12-13.

Moser, I. 2006. Tuberculosis in veterinary medicine – in an officially tuberculosis-free Member State of the European Union. (Proceedings of the 24th Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society (in cooperation with FLI and DVG), Jena, Germany, 08.-10. October 2006, S. 15).

Moser, I., K. Bauer und H. Hotzel. 2006. Tuberkulosediagnostik beim Rind - Möglichkeiten der Verbesserung durch molekulare Methoden. (Proceedings der 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit [LGL], 26.-29. September 2006 in Garmisch-Partenkirchen).

Moser, I., K. Bauer und H. Hotzel. 2006. Erfahrungen mit dem molekularen Nachweis von Mykobakterieninfektionen in Säugergewebe. (3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose, 10. und 11. Oktober 2006, Jena, Tagungsband).

Moser. I., M. Peters, S. Deppenmeier, W. Biesenbach und W. Prodinger. 2006. M*ycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* infection in pet animals report of three extraordinary cases. (27th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, July 9-12, London, Proceedings, O21).

Müller, J., W. Müller und I. Hänel. 2006. Virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni.* (Abstract) (VAAM Jahrestagung 2006, Jena, 19.-22. März 2006, Tagungsband, S. 87).

Müller, J., F. Schulze, I. Hänel und H. Hotzel. 2006. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. (Biospektrum. Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung, Jena, 19.-22. März 2006, S. 87).

Müller, T. und C. Freuling. 2006. Zu Fragen der Fledermaustollwut 11, Nyctalus **2-3:**190-197.

Müller, T., C. Freuling, T. Selhorst und R. Ulrich. 2006. Tollwut – Ende in Sicht, Die Pirsch **14:** 8-13.

Müller, T., C. Freuling, T. Selhorst und R. Ulrich. 2006. Fledermaustollwut. Die Pirsch **14:**13.

Oechtering, G.U., C. Nöller, M. Alef, P. Reinhold, J. Hueber, I. Kiefer, E. Ludewig und K.D. Budras. 2006. A new approach to brachycephalic airway syndrome: Videoscopic endonasal laser therapy. (Proceedings of the 24th Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society (in cooperation with FLI and DVG), Jena, Germany, 08.-10. October 2006, S. 99).

Pantchev, A., R. Bauerfeind, K. Sachse und R. Sting. 2006. Detection of chlamydiae in domestic animals using species-specific real-time PCR assays. (Proceedings of the 4th Annual Workshop of COST Action 855 "Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications", Edinburgh/UK, September 3-5, S. 73).

Pieper, J., U. Methner und A. Berndt. 2006. Gamma/ delta T cell subsets in response to *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. (International Symposium „Salmonella and Salmonellosis“, Saint-Malo, France, 10-12 May 2006, S. 287-288).

Rabsch, W., U. Methner, R. Prager, P. Braun, A. Bäumler und H. Tschäpe. 2006. Where did the *S.* Enteritidis epidemic come from? Retrospective analysis by the new phage typing scheme (Ward) and ribotyping in Eastern Germany before 1989 reveals heterogeneity of clones in laying flocks. (International Symposium „Salmonella and Salmonellosis“, Saint-Malo, France, 10-12 May 2006, S. 323-327).

Reichel, T., S. Reißig, C. Schröder, A. Langenberg und P. Reinhold. 2006. Vergleich der IOS-Daten und der mittels FAMOS rekalkulierten Daten von Resistance (R) und Reactance (X) zwischen Versuchstieren und Kontrolltieren bei einer respiratorischen Infektion mit Mykoplasmen. Pneumologie **60**:63-64 (Abstract 10).

Reinhold, P., E. Schubert, E. Liebler-Tenorio, C. Schroeder, S. Reissig, T. Reichel und K. Sachse. 2006. Respiratory model of *Mycoplasma bovis* infection in calves. (Proceedings of the 16th International Congress of the Intl. Organization for Mycoplasmology, Cambridge/UK, 9-14 July, S. 50).

Reißig, S., J. Jäger, A. Langenberg, H.-J. Smith und P. Reinhold. 2006. Abhängigkeit ausgewählter kapnovolumetrischer Parameter von physiologischen und ventilatorischen Kenngrößen beim Kalb. Pneumologie **60**:67 (Abstract 16).

Reißig, S., J. Jäger, A. Langenberg, H.-J. Smith, P. Reinhold. 2006. Die Kapnovolumetrie in der Lungenfunktionsdiagnostik und ihre Anwendung beim Kalb. Pneumologie **60**:Supplement S90 (V362).

Sachse. K. 2006. Chlamydiae as agents of respiratory infections. (Proceedings of the 24th Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society (in cooperation with FLI and DVG), Jena, Germany, 08.-10. October 2006, S. 2).

Sachse, K. 2006. Chlamydial infections in animals: Zoonotic, epidemiologic and economic aspects. (Proceedings of the 87th Annual Meeting of Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), Chicago/IL, USA, December 3-5, S. 12).

Sachse, K., H. Hotzel, E. Schubert und B. Hoffmann. 2006. A real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycoplasma bovis*. (Proceedings of the 16th International Congress of the Intl. Organization for Mycoplasmology, Cambridge/UK, 9-14 July, S. 125).

Sachse, K., H. Hotzel, P. Slickers und R. Ehricht. 2006. Direktnachweis, Identifizierung und Genotypisierung von Chlamydien mit Hilfe eines DNA-Mikroarraysystems. (Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie der DVG, Wetzlar, 15.-17. Juni 2006, Tagungsband, S. 20).

Sachse, K., H. Hotzel, A. Dell'Ariccia, P. Reinhold, E. Schubert, E. Liebler-Tenorio und D. Yogev. 2006. Evidence of surface antigen variation of *Mycoplasma bovis* in experimentally induced respiratory infection of calves. (Proceedings of the 16th International Congress of the Intl. Organization for Mycoplasmology, Cambridge/UK, 9-14 July, S. 92).

Schirrmeier, H. 2006. BVDV-eradication/control program in Germany. (BVDV-Symposium – The use of ear notches in the eradication/control of BVDV, Lelystad, 5.-6. April 2006, Tagungsband).

Schlüter, H., M. Kramer und V. Kaden. 2006. Nach der Krise ist vor der Krise – Gedanken zur Tierseuchenbekämpfung in der Bundesrepublik Deutschland. – Dt. Tierärztebl. **54:**698-703.

Schröder, C., J. Jäger, M. Rothe und P. Reinhold. 2006. Nachweis von Entzündungsmarkern in Atemkondensaten, BALF- und Serumproben bei Kälbern verschiedener Herkunftsbestände. Pneumologie **60**:61-62 (Abstract 5).

Seyboldt, C., F. Schulze und H. Hotzel. 2006. Die Aufgaben und Möglichkeiten des Nationalen Referenzlabors für Rauschbrand. (Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) Wetzlar, 15.–17. Juni 2006, Tagungsband, S. 68).

Siegling-Vlitakis, C., P. Reinhold, H. Martens und H. Hartmann. 2006. Influence of respiratory infections on active ion transport in calves. (Proceedings of the 24th Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society (in cooperation with FLI and DVG), Jena, Germany, 08.-10. October 2006, S. 55).

Skrypnyk, A., A. Zavgorodniy, B. Stegniy und I. Moser. 2006. Mycobacterial infections in cattle in Ukraine during 2001 – 2005. (27th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 2006, July 9-12, London, UK, S. 35).

Skrypnyk, A., A. Zavgorodniy, B. Stegniy, V. Skrypnyk und I. Moser. 2006. Epizootic Analysis of Cattle Mycobacterial Infections in Ukraine during 2001-2005. (3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose, 10. und 11. Oktober 2006, Jena, Tagungsband).

Staubach, C., R. Schröder und J. Teuffert. 2006. TSN-basiertes Modell zur Ressourcenabschätzung bei Ausbrüchen von hochinfektiösen Tierkrankheiten. (DVG-Fachgruppe Epidemiologie und Dokumentation "Von der Überwachung zur Bekämpfung". Bern, 6.-8. Sept. 2006).

Süss, J. 2006. Durch Zecken übertragene Krankheiten 1 (Themenheft). Ärzteblatt Thüringen **17**:215-228.

Süss, J. 2006. Durch Zecken übertragene Krankheiten 2 (Themenheft). Ärzteblatt Thüringen **17**:259-268.

Süss, J. 2006. Einige kritische Anmerkungen zum Beitrag „FSME-Gebiete in Deutschland mit noch geringem Infektionsrisiko" von A. Windorfer und C. Schönfeld. Impfdialog 1/11-13.

Süss, J., C. Klaus und O. Kahl (Ed.). 2006. Proceedings of the VIII Int. Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases 2005 (IPS VIII). Int. J. Med. Microbiol. **296**, Suppl. 40:1-316.

Süss, J., R. Kaiser, P. Kimmig und W. Hellenbrand. 2006. FSME – Untersuchung belegt ungenügenden Impfschutz in den Risikogebieten Deutschlands. Epi. Bull. 12/91-93.

Süss, J., C. Klaus, W. Dorn und G. Hesse. 2006. Verbreitungsgebiete des Gemeinen Holzbocks *(Ixodes ricinus)* und Epidemiologie der Lyme-Borreliose und der FSME in Thüringen. Ärzteblatt Thüringen **17**:225-228.

Süss, J. und C. Klaus. 2006. Jetzt stechen sie wieder! In immer mehr Regionen sind Zecken FSME-Träger. MMW - Fortschr. Med. **22**:35-39.

Tackmann, K., J. Goretzki, A. Sutor, S. Schwarz und F.J. Conraths. (2006). Der Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*) als neuer Endwirt für *Echinococcus multilocularis* in Ostdeutschland – erste Ergebnisse einer Studie in Brandenburg. Beitr. Jagd- und Wildforschung

Teuffert, J., M. Kramer, C. Staubach und K.R. Depner. 2006. Aktuelles zur Epidemiologie der Schweinepest. BpT-Kongress Nürnberg, 09.-11. Nov. 2006, Vortragsband Schwein, Rind, Praxisgestaltung, S. 58-66.

Teuffert, J., M. Kramer, C. Staubach, F. Unger und K.R. Depner. 2006. Das Schweinepestgeschehen in Deutschland von 1993 bis zur Gegenwart unter besonderer Berücksichtigung der aktuellen Situation in Nordrhein-Westfalen. (Seminarbericht des Bundesverbandes der beamteten Tierärzte "Nach der Seuche ist vor der Seuche", S. 67-87).

Ulrich, R., S. Essbauer, J. Schmidt, M. Schütt, J. Koch, F.J. Conraths, H.-J. Pelz und M. Wenk. 2006. Zunehmende Gefährdung durch Nagetier-übertragene Hantaviren? AFZ - Der Wald **61:**90-94.

Ulrich, R., S. Essbauer und M. Wenk. 2006. Hantaviren und Netzwerk – „Nagetier-übertragene Pathogene". Pest Control News, 6-9.

Ulrich, R. und J. Jacob. 2006. Hantaviren IV. Immunologie aktuell **17:**2-3.

Unger, F. 2006. Zoonoses, Food Safety and Public Health Aspects of Livestock Production. ITC Case Studies at National and Regional Levels (Conference Paper). (In: Proceedings International Conference on Livestock Agriculture in West and Central Africa: Achievements in the past 25 years, challenges ahead and the way forward (Banjul, Nov. 2004). ITC - CIRDES – CTA).

Unger, F., A. Goumou, C.N. Apia, E. Forster, M. Konté, S. Münstermann und A. Schönefeld. 2006. Selected aspects of the importance of Brucellosis in West Africa. (In: Proceedings. International research conference for brucellosis in small ruminants. Faculty of Veterinary Medicine Skopje, R. Macedonia. 28-30.11.2005, Skopje, Macedonia).

Unger, F., E. Forster, A. Goumou, Y. Thiongane und A. Schoenefeld. 2006. Selected Diseases (B. melitensis & Rift Valley Fever) of Small Ruminants in Traditional Farming Systems with Potential Public Health Impact in The Gambia and Guinea - a Pilot Study. (End-of-Project Report, International Trypanotolerance Centre (ITC), S. 22).

Unger, F. 2006. Salmonellosis in The Gambia and Senegal – current status of knowledge. (In: Proceedings, Epidemiology and control of zoonotic diseases in the Gambia and West Africa. Kick off – workshop, ITC-VLIR research project, 26-27.10.2006, ITC, Banjul, The Gambia, S. 19-24).

Vahlenkamp, T.W. 2006. Bewährte und neue infektionsmedizinische Tests in der Kleintiermedizin. Prakt. Tierarzt **87:**948-954.

Vahlenkamp, T.W. 2006. Influenza bei Katzen. Dtsch. Tierärztebl. **54(4):**414-419.

Vahlenkamp, T.W. 2006. Bewährte und neue infektionsdiagnostische Tests für die Kleintiermedizin. (14. bpt-Intensivfortbildung Kleintierpraxis „Labordiagnostik, Infektionsmedizin und Zoonosen". ISBN 3-937266-10-0, S. 23-27).

Vahlenkamp, T.W. 2006. Influenzavirusinfektionen bei Haustieren. (52. Jahrestagung der DGK-DVG. ISBN-3-938026-95-2, S. 86-89).

Vahlenkamp, T.W. 2006. Influenzavirusinfektionen bei der Katze. (bpt-Kongress Nürnberg, ISBN-3-937266-13-6, S. 156-159).

Veits, J., D. Wiesner, E. Starick, D. Lüschow, A. Römer-Oberdörfer, O. Werner, T.C. Mettenleiter und W. Fuchs. 2006. Gentechnisch veränderte Geflügelviren als Helfer im Kampf gegen die „Vogelgrippe". Forschungsreport **1:**4-7.

Werner, O., E. Starick, T. Harder, J. Teifke, B. Hoffmann, A. Globig, T.C. Mettenleiter und M. Beer. 2006. Infection studies with highly H5N1 and H7N7 avian influenza virus: A short overview (Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting, München, 15.-18. März 2006, Abstractband, S. 500).

Wolf, D., M. Gauly, W. Huanca, O. Cardenas, C. Bauer und G. Schares. 2006. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in South American camelids. (In: Gerken, M. and Renieri, C. (Eds.) South American camelids research: Volume 1. Proceedings of the 4th European symposium on South American camelids and DECAMA European seminar, Göttingen/D (7-9 Oct 2004). Wageningen Academic Publ., S. 285-286).

Wolf, P.U., W. Uhl, S. Gerst, C. Wolf, K. Gerst, M. Klopries, J.P. Teifke, R. Klopfleisch, T. Harder, O. Werner, B. Hoffmann, E. Starick, E. Mundt, M. Beer und T.C. Mettenleiter. 2006. Erstbeschreibung diagnostischer Leitbefunde. Letal verlaufende Influenza bei Hauskatzen nach natürlicher Infektion mit H5N1/Asia in Deutschland. Dtsch. Tierärztebl. **54(4):**426-431.

Wolfarth, K., H. Becker, J. Süss und E. Petri. 2006. Autochthone FSME Erkrankungen 2006 in Brandenburg. Berliner Ärzteblatt **12**:22-24.

2.3 Buchbeiträge

Conraths, F.J. 2006. Epidemiologie. In: Schnieder, T. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey Verlag

Kemper, N., A. Aschfalk und C. Höller. 2006. 14. Hygienic status of soil and surface waters in reindeer herding areas in northernmost Europe. In: Forbes, B.C., Bölter, M., Müller-Wille, L., Hukkinen, J., Müller, F., Gunslay, N., Konstantinov, Y. (eds.): Reindeer management in Northernmost Europe: Linking practical and scientific knowledge in social-ecological studies. Ecological Studies 184, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 297-313.

Vahlenkamp, T.W., M.B. Tompkins und W.A.F. Tompkins. 2006. FIV as a model for AIDS pathogenesis studies. In: Animal models of HIV disease and control. Kluver Academic/Plenum Publishers Springer Verlag. ISBN 0-387-25740-3.

3 Habilitationen, Dissertationen und Diplomarbeiten

3.1 Habilitationen

keine

3.2 Dissertationen

Adelmann, M.: Entwicklung einer oral applizierbaren festen Arzneiform zur Immunisierung von Forellen gegen die Virale Hämorrhagische Septikämie (Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Bagon, A.: Untersuchungen zu Nachweis und Differenzierung von Campylobacter fetus subsp. venerealis beim Rind mit konventionellen und molekularbiologischen Methoden (Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig)

Fetzer, Ch.: Generierung attenuierter Varianten des BVD-Virus Typ 2 mithilfe eines infektiösen cDNA-Klons und funktionelle Untersuchungen am E^{rns} Protein (Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Gall, A.: Etablierung, Validierung und praktische Anwendung einer multiplex Real-time-RT-PCR zum Nachweis des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

Hammer, M.: Expression des Hauptstrukturproteins des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in transgenen Pflanzen – Untersuchungen zur Antigenität und Immunogenität (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

Hoffmann, Ch.: Morphologisch-funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese der equinen Endometriose unter besonderer Berücksichtigung endometrialer Proteine und Kohlenhydrate (Fachbereich Veterinärmedizin, Universität Leipzig)

Jäger, J.: Bewertung von Chlamydien-assoziierten Veränderungen der Lungenfunktion bei Kalb und Schwein mittels Impuls-Oszilloresistometrie und der Software FAMOS (Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin)

Meyer, B.: Chromosomale Aberrationen der frühen zervikalen Karzinogenese (Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Michael, K.: Qualitative und quantitative massenspektrometrische Analyse von Virionen des Pseudorabies Virus (Medizinische Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Sänger, K.: Untersuchungen zur Pathogenität, Replikationsfähigkeit und Fremdgenexpression rekombinanter porziner Coronaviren (r-TGEV) (Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Schröder, C.: Untersuchung zu Inhaltsstoffen des Atemkondensates beim Kalb (Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin)

Seifert, J.: Auswirkungen einer experimentellen Infizierung von Kälbern mit *Mannheimia haemolytica* A1 auf Funktionen der äußeren Atmung (Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin)

Tews, B.A.: Charakterisierung des Struktur-Glykoproteins E^{rns} des Virus der bovinen viralen Diarrhöe (Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Utke, K.: Untersuchungen zur antiviralen zellvermittelten Zytotoxizität bei Fischen am Modell der Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforelle Oncorhynchus mykiss (Institut für Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Wiesner, D.: Identifizierung von fünf Tegumentproteinen (UL37, UL46, UL47, UL48, Ul49) sowie von zwei Nichtstrukturproteinen (UL31, gG) des Virus der infektiösen Laryngotracheitis der Hühner und Evaluierung einer UL47-Deletionsmutante als potentielle Lebendvirus-Vakzine (Tierärztliche Fakultät, Justus-Liebig-Universität Gießen)

3.3 Diplomarbeiten

Dröbner, K.: Rolle von NF-kB bei der Immunantwort nach Infektionen mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Glawe, A.: Pestivirale Replikons: Charakterisierung von RNA-Replikation, Verpackung in Virionen und Genexpression (Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Jugert, C.: Untersuchungen zur Rolle von Makrophagen bei der Abwehr verschiedener Salmonella-Serovaren im aviären Zäkum (Biologisch-pharmazeutische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Knobloch, H.: Biologische Variabilität von ausgewählten Entzündungsmarkern (H_2O_2, Nitrit, LTB_4, 8-iso-Prostan, pH-Wert und Laktat) in Atemkondensat und Blut beim Kalb unter Applikation neuer Messverfahren (Fachhochschule Jena)

Winkler, C.: Untersuchungen zur Ursache des Bachforellensterbens in voralpinen Flüssen Bayerns (Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie, Technische Universität Dresden).

4 Vorträge und Poster

Auf wissenschaftlichen Fachtagungen und Kongressen im In- und Ausland wurden von den Mitarbeitern des FLI zahlreiche Vorträge und Poster präsentiert. Aus Platzgründen werden diese nicht einzeln aufgeführt.