



Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Friedrich-Loeffler-Institut

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Jahresbericht 2005



Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz

Friedrich-Loeffler-Institut

Bundesforschungsinstitut für

Tiergesundheit

Jahresbericht 2005

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

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

Schriftleitung:
PD Dr. Dr. Th.W. Vahlenkamp
E-mail: thomas.vahlenkamp@fli.bund.de

Redaktion:
A. Beidler
E-mail: anette.beidler@fli.bund.de

Insel Riems, 2006

ISSN: 1861-0005

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

der nun vorliegende Jahresbericht 2005 soll Ihnen wiederum einen Überblick über die Arbeiten des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, geben. Auch im vergangenen Jahr lag das FLI im Zentrum des Interesses von Politik und Öffentlichkeit. 'Vogelgrippe' ist das derzeit (fast) alles beherrschende Stichwort, das auch wieder einmal deutlich macht, wie wichtig und weitreichend die Arbeit des FLI nicht nur für das Bundesministerium ist. Besonders durch die mögliche humanmedizinische Relevanz, die ja umfangreich in allen Medien diskutiert und über deren Ausmaß vielfältig spekuliert wurde, hat die Geflügelpest nun eine über den veterinärmedizinischen Bereich hinaus gehende Beachtung gefunden. Im Tierseuchengesetz ist dem FLI bekanntlich die Forschung an Tierseuchen (und dies beinhaltet explizit die Zoonosen, d.h. die vom Tier auf den Menschen übertragbaren Krankheiten) aufgegeben worden, so dass die Bearbeitung dieser Thematik zu unseren ureigensten Aufgaben gehört. Das Thema betrifft dann auch alle Standorte des FLI, wenngleich unterschiedlich stark, was auch zeigt, welche wichtige Rolle gerade die umfassende Bearbeitung der verschiedenen Aspekte einer Infektionskrankheit von der Diagnostik über die Epidemiologie bis hin zur Impfstoffentwicklung und Grundlagenforschung im FLI spielt.

Dem gegenüber wurde fast nicht bemerkt, dass auch die Schweinepest wieder in Deutschland bei Wildschweinen aufgetreten ist und uns auch die Tollwut noch einige Probleme bereitet. Bei beiden Erkrankungen laufen unter der Koordination und wissenschaftlichen Begleitung durch das FLI Programme mit dem Ziel, durch Schluckimpfung die Infektionen in Deutschland endgültig zu tilgen. Wir hoffen alle, dass dies kurzfristig gelingen wird. Auch solche Zoonosen, die bisher in der Öffentlichkeit nicht oder nur wenig beachtet wurden, kamen wieder ins Rampenlicht. Ich erinnere nur an die Ausbrüche von Ornithose und Q-Fieber in Thüringen, wo unser Standort Jena 'direkt vor Ort' den Behörden wertvolle Hilfe geben konnte. Daneben geht fast unter, dass es schon (oder erst?) fünf Jahre her ist, dass der erste Fall von BSE bei einem in Deutschland geborenen und aufgezogenen Rind festgestellt wurde. Aber auch hier ist die Wissenschaft immer noch gefragt, besonders im Hinblick auf mögliche Lockerungen der Schutzmaßnahmen, ohne die Sicherheit des Verbrauchers oder die Bekämpfung der BSE zu beeinträchtigen.

Neben den Aufgaben im nationalen Rahmen profiliert sich das FLI auch immer mehr im internationalen Bereich. Die im April unter Mitwirkung aller Standorte ausgerichtete Tagung 'Animal disease control in the 21st century' war ein großer Erfolg, wobei einem internationalen Publikum von Tierseuchenexperten aus 20 Ländern die Leistungsfähigkeit des FLI dargestellt werden konnte. Im Mai wurden dem FLI von der Vollversammlung des internationalen Tierseuchenamtes (OIE) weitere OIE-Referenzlaboratorien für aviäre Influenza/Newcastle Disease, bovine Herpesvirus-1 Infektion und Brucellose zugesprochen, was die Akzeptanz der Qualität der Arbeit des FLI auch im internationalen Rahmen unterstreicht. Auf diesem Weg wollen wir weiter voranschreiten. Das FLI unterstützt mit Experten auch die Arbeit der OIE, der Welternährungsorganisation (FAO) und der Europäischen Union. Diese Missionen sind besonders vor dem Hintergrund von Bedeutung, dass Tierseuchenbekämpfung vor Ort auch das Risiko einer Einschleppung nach Deutschland minimiert. Dies zeigt aktuell ja auch die Problematik der Geflügelpest. Selbstverständlich geschieht dies alles nicht zu Ungunsten der nationalen Aufgaben und die Riemser Diagnostiktage im Dezember demonstrierten eindrucksvoll, wie intensiv die Interaktion und Kooperation mit den relevanten Behörden auf Bundes- und Länderebene weiterhin ist.

Ein großes Ziel des FLI ist die Einweihung der geplanten neuen Stall- und Laborgebäude am 100. Jahrestag der Gründung des weltweit ältesten virologischen Forschungsinstituts auf der Insel Riems. Die Planungen wurden dieses Jahr zügig weitergeführt, wobei ich hierbei besonders die enge und pragmatische Zusammenarbeit aller Beteiligten, der Planer, der Baubehörden, der verschiedenen beteiligten Ministerien und der Beschäftigten des FLI hervorheben möchte. Ohne diese problemlose Kooperation wäre eine so kurzfristige Fertigstellung der ersten Planungsphase (von März bis September standen nur sieben Monate zur Verfügung) nicht möglich gewesen. Nachdem nun auch der Abriss der

maroden Altgebäude auf der Insel Riems erfolgt ist, steht einem ersten Spatenstich noch in diesem Jahr nichts im Wege.

All diese Erfolge und noch viele weitere, die ich nicht alle aufzählen kann, wären ohne die engagierte und tatkräftige Mitarbeit aller Beschäftigten des FLI nicht möglich. Wissenschaft kann nur erfolgreich sein, wenn das Umfeld stimmt. Dazu gehört nicht nur die technische Assistenz im Labor, sondern auch das manchmal so selbstverständlich hingegenommene Funktionieren von Technik und Infrastruktur, die verwaltungsmäßige Begleitung und Koordination sowie die meist unauffällige, aber effiziente Hilfestellung an vielen 'Ecken und Enden'. Hierfür möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern ganz herzlich danken.

Ihnen wünsche ich beim Lesen des doch recht umfangreichen Jahresberichts viel Vergnügen, vielleicht einige neue Erkenntnisse und daneben umfangreiche 'Aha-' und möglichst wenige 'Déjà vu'-Erlebnisse.

Mit besten Grüßen
Ihr



Prof. Dr. Thomas C. Mettenleiter



Inhaltsverzeichnis

I.	Aufgaben	7
II.	Überblick	
	Organisation	9
	Die Institute	11
	Beschäftigte und Organigramm	19
III.	Ausgewählte Schwerpunktthemen	23
	Institut für Molekularbiologie:	25
	In virale Membranglykoproteine integrierte, nach Spaltung durch Furin freigesetzte Proteine: Ein neuartiger Ansatz zur Expression und Sekretion biologisch aktiver Polypeptide	
	Institut für Virusdiagnostik:	33
	Ringtests zur Labordiagnose anzeigepflichtiger Tierseuchen	
	Institut für Infektionsmedizin:	41
	Retroviren der Wiederkäuer: Tierseuchenerreger, Onkogene und Immunsuppression	
	Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger:	51
	Synthetische Prionen	
	Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen:	57
	Die Salmonellose der Rinder in der Bundesrepublik Deutschland	
	Institut für molekulare Pathogenese:	67
	Das aviäre Immunsystem und seine Reaktionen bei der <i>Salmonella</i> -Infektion	
	Institut für Immunologie:	77
	Die Proteinkonformation bestimmt die Sensitivität infektiöser Hamster-Scrapie-Prionen gegenüber einer Behandlung mit hohem Druck	
	Institut für Epidemiologie:	87
	Zur BSE-Situation bei in Deutschland geborenen Rindern fünf Jahre nach Einführung des totalen Verfütterungsverbotes	
IV.	Laufende Forschungsprojekte	
	1 Viren	
	1.1 Picornaviren	93
	1.2 Caliciviren	95
	1.3 Coronaviren	98
	1.4 Flaviviren	99
	1.5 Rhabdoviren	108
	1.6 Paramyxoviren	113

1.7	Bornaviren	115
1.8	Orthomyxoviren	116
1.9	Birnaviren	121
1.10	Reoviren	123
1.11	Retroviren	125
1.12	Pockenviren	126
1.13	Papillomaviren	128
1.14	Herpesviren	129
1.15	Iridoviren	142
1.16	Bunyaviren	143
1.17	Immunologie	144
2	Bakterien	
2.1	Escherichia coli	147
2.2	Chlamydien und Coxiellen	148
2.3	Mykobakterien	151
2.4	Campylobacter	154
2.5	Salmonellen	157
2.6	Burkholderia mallei	158
2.7	Brucellen	158
2.8	Durch Zecken übertragene Krankheiten	159
2.9	Bakterielle und virale Mischinfektionen	159
3	Übertragbare Spongiforme Enzephalopathien	160
4	Parasiten	
4.1	Neospora caninum	170
4.2	Echinococcus multilocularis	172
4.3	Tritrichomonas foetus	173
5	Pathophysiologie und Lungenfunktionsdiagnostik	173
6	Histologische, immunhistologische und ultrastrukturelle Untersuchungen	174
7	Diagnostikentwicklung und neue Nachweisverfahren	176
8	Zellbank und Virusstammhaltung	
8.1	Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin	178
8.2	Virusstammhaltung (Riemser Virusbank)	180
9	Informatik, Biostatistik, Dokumentation	181
10	Behördliche Aufgaben und Diagnostik	
10.1	Zulassungen und Chargenprüfungen	183

10.2	Diagnostische Untersuchungen	184
10.3	Aufgaben im Rahmen des Gentechnikrechts	195
10.4	Stellungnahmen und Berichte	195
10.5	Abgabe von Diagnostika	195
10.6	Referenzlaboratorien	197
V.	Organisierte Veranstaltungen	217
VI.	Wissenschaftliche Zusammenarbeit	219
VII.	Veröffentlichungen	227

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 von Tierseuchenausbrüchen durch. Außerdem wirkt es bei der Untersuchung von Tieren oder Tiererzeugnissen mit, die zur Ein- oder Ausfuhr bestimmt sind.

Die 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 und bovine Herpesvirus 1-Infektion) und ein WHO-Collaborating Centre für Tollwut. 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

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. Th. C. Mettenleiter
Örtlicher administrativer Vertreter: Dr. rer. nat. K. Sachse (komm. Leitung)
Örtlicher 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

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. Th. C. Mettenleiter
Örtlicher administrativer Vertreter: Direktor und Professor Prof. Dr. med. vet. L. Stitz
Örtlicher 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

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. Th. C. Mettenleiter
Örtlicher administrativer Vertreter: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. F.J. Conraths
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.-Biol. S. Böttcher (DFG, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. W. Fuchs, Dipl.-Biol. S. Gentner (DFG, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. C. Höhle (teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. D. Kühnel (Drittmittel, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. A. Karger, Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. B. Klupp, Dipl.-Biol. M. Krautwald (DFG, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. T. Letzel (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl.-Ing. (FH) K. Michael (DFG, teilzeitbesch.), Wiss. Direktor PD Dr. med. vet. E. Mundt, Dr. rer. nat. I. Reimann, Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. A. Angela-Oberdörfer, Dr. med. vet. J. Veits, Dr. rer. nat. S. Weber, Tierärztin D. Wiesner (Drittmittel, teilzeitbesch.).

Volontäre:

J. Altenschmidt, I. Burghardt, A. Czegledi, A. Glawe, U. Henrion, D. Jung, S. Kühnel, J. Kuzinski, A. Müller, B. Nowack, D. Richter, I. Richter, D. Rosenkranz, S. Roth, A. Sadowski, K. Scheffler, R. Strucker, H. Tierbach, E. Topfstedt, M. Vorpahl, K. Wenzel

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), Birnaviren (Infektiöse Bursitis des Huhns), Rhabdoviren (Virale hämorrhagische Septikämie, Infektiöse hämatopoetische Nekrose, Frühlingsvirämie der Karpfen), 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. Schirrmeyer

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Tierärztin K. Brehm (teilzeitbesch., seit 02/05), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. M. Dauber, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. K.R. Depner, Dr. rer. nat. M. Durban (seit 09/05), Tierärztin A. Gall (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin A. Globig (Drittmittel, teilzeitbesch.), PD Dr. med. vet. T. Harder (seit 04/05), Dr. med. vet. B. Hoffmann (seit 06/05), Tierärztin D. Kalthoff (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. med. vet. P. König, Dipl.-Biol. K. Kühn (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. K. Mischkale (Drittmittel, teilzeitbesch. seit 03/05), Dipl.-Chem. E. Starick, Dipl.-Chem. H.-G. Strebelow, Wiss. Direktorin Dr. med. vet. O. Werner

Volontäre:

S. Eichstädt, A. Glawe, M. Hammer, M. Hanczaruk, U. Joachim, C. Kaiser, J. Kuhl, N. Kumar, M. Linster, J. Zehmke

Forschung und behördliche Aufgaben:

Im **Institut für Virusdiagnostik** werden veterinärmedizinisch bedeutsame Viruserkrankungen bei Nutztieren schwerpunktmäßig aus diagnostischer und differenzialdiagnostischer Sicht bearbeitet. Besonderes Augenmerk ist 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 1, Infektiöse Anämie der Einhufer, Teschener Krankheit, Maul- und Klauenseuche, Vesikuläre Schweinekrankheit und Afrikanische Schweinepest, das Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhoe/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 von virusbedingten 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 von monoklonalen Antikörpern.

Institut für Infektionsmedizin (IMED)

Leitung: Direktor und Professor Dr. med. vet. habil. V. Kaden
Vertretung: Dr. med. vet. R. Riebe (bis 09/05), Wiss. Direktor Prof. Dr. med. vet. J.P. Teifke (seit 10/05)

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dipl.-Pharm. M. Adelman (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 04/05), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. S.M. Bergmann, Tierärztin A. Brauer (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. Klopffleisch, 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. Riehardt (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin K. Saenger (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin D. Schrudde (Drittmittel, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. H. Schütze, Dipl.-Biol. P. Stumpf (Drittmittel, teilzeitbesch.)

Volontäre:

M. Adelman, M. Beuge, C. Brüggemann, S. Habel, J. Köhler, P. Kotterba, C. Maresch, J. Nobmann, M. Richter, S. Schröder, F.-M. Schulz, K. Utke, C. Winkler

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 von virusbedingten Fischkrankheiten sowie zur Immunologie von Nutzfischen. In Zusammenarbeit mit anderen Instituten des FLI werden Studien zur Immunpathologie boviner Retrovirusinfektionen, zur molekularen Diagnostik und vergleichenden Pathologie der klassischen Geflügelpest und Newcastle Disease, zur Pathogenese der Rabbit Haemorrhagic Disease, 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 das Nationale Referenzlabor für Fischkrankheiten und das Nationale Referenzlabor für Muschelkrankheiten sowie die Versuchstierhaltung angesiedelt. 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 Diagnose 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:

Dr. rer. nat. A. Brenn (Drittmittel), Dr. rer. nat. M. Eiden, Dr. rer. nat. M. Geissen (Drittmittel, bis 12/05), Tierärztin A. Gretzschel (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. med. vet. B. Hoffmann (bis 06/05), Tierärztin C. Hoffmann (Drittmittel), Dr. rer. nat. M. Keller (seit 07/05), Tierärztin L. Kupfer (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin A. Oelschlegel (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. J. Proft (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin C. Reckzeh (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 11/05), Dr. rer. nat. G. Wachlin (Drittmittel), Dr. med. vet. A. Weber, Dr. med. vet. U. Ziegler

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)
Vertretung: Dr. med. vet. U. Methner

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. U. Dinjus (bis 01/05), Dr. med. vet. M. Elschner, Dipl.-Biol. M. Glaser (teilzeitbesch., seit 10/05), Dipl.-Biol. S. Göllner (teilzeitbesch., bis 03/05), Dipl.-Biol. A. Haase (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. med. vet. M. Heller, Dr. rer. nat. M. Höfer (bis 03/05), Dr. med. vet. C. Klaus, Dr. med. vet. F. Melzer, Dr. rer. nat. W. Müller, Dr. med. vet. P. Otto, Dr. med. vet. A. Raßbach, Dipl.-Biol. R. Reiche (Drittmittel), Dr. rer. nat. B. Roth (Drittmittel, seit 09/05), Dr. rer. nat. G. Schmoock (seit 12/05), Dr. rer. nat. E. Schubert, Dr. med. vet. C. Seyboldt (seit 09/05), Dir. u. Prof. PD Dr. rer. nat. habil. J. Süß

Volontäre:

S. Göllner, I. Friedelt, N. Jänisch, R. Kunze, U. Lischke

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 Wildtier einbezogen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten dienen der Entwicklung und Optimierung diagnostischer Verfahren sowie der Erarbeitung von Bekämpfungsstrategien. Im Mittelpunkt der Forschungstätigkeit stehen durch Salmonellen, Chlamydien, Brucellen und Mycoplasmen 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, Psittakose, 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: Prof. Dr. E. Liebler-Tenorio

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dr. rer. nat. A. Berndt, Dr. rer. nat. E. Borrmann, Dr. rer. nat. J. Gottschaldt, Dr. rer. nat. I. Hänel, Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. H. Hotzel, PD Dr. med. vet. habil. I. Moser, Dr. rer. nat. J. Müller, Tierärztin J. Jäger (teilzeitbesch., bis 03/05), Dr. med. vet. H. Köhler, Dipl.-Biol. B. Meyer (seit 09/05), Dr. rer. nat. P. Möbius, Dipl.-Biol. J. Pieper (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierarzt T. Reichel (teilzeitbesch., 03-08/05), Tierärztin S. Reißig (teilzeitbesch., bis 04/05), Tierärztin C. Schröder (teilzeitbesch., bis 04/05), Dr. med. vet. habil. F. Schulze, Dipl.-Ing. E. Thalmann

Volontäre:

A. Bagon, K. Bauer, B. González Carvajal, F. Gierke, J. Jäger, C. Jugert, T. Kämpfer, H. Knobloch, C. Kummer, A.I. Raya Bermudez, T. Reichel, S. Reißig, R. Rubinek, C. Schröder, J. Seifert, J. Seipel, A. Wilhelm

Bioinformatik:

Dr. rer. nat. R. Diller

Forschung und behördliche Aufgaben:

Das **Institut für molekulare Pathogenese** wurde im Jahre 2005 grundlegend reorganisiert. Schwerpunktthemen der im IMP durchgeführten Forschungs- und Referenz Tätigkeiten stellen nunmehr Mykobakterien- und Campylobacter-Infektionen dar. In diesem Zusammenhang sind dem IMP folgende Nationale Referenzlaboratorien (NRL) zugeordnet: NRL Tuberkulose, NRL Paratuberkulose, NRL Rauschbrand, NRL Vibrionenseuche sowie das NRL Beschälseuche. Von den NRL werden umfangreiche hoheitliche Aufgaben im Sinne der Überwachung sowie der Verbesserung der Diagnostik von anzeigepflichtigen Tierseuchen, meldepflichtigen Tierkrankheiten und Zoonosen 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 Potential oder großer ökonomischer Relevanz (z.B. Salmonellen-, Chlamydien-, Mykoplasmen- oder virale Infektionen). Die Grundlage der wissenschaftlichen Kompetenz des Instituts bilden die auf den Gebieten der Immunologie (Schwerpunkt Geflügel), Pathologie/Histologie sowie 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 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.), Dr. Dipl. Biol. S. Bourteele (Drittmittel), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. P.-J. Enzmann, Dipl. Biochem. J. Fricke (DFG, teilzeitbesch.), Dr. Dipl. Biol. B. Klein (Drittmittel), Dr. med. vet. B. Klevenz (Drittmittel), Dipl. Biol. C. Luttermann (DFG, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat PD 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 PD Dr. rer. nat. O. Planz, Wiss. Dir. Dr. rer. nat. H.-J. Rziha, Tierärztin E.-M. Schürmann (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl. Biochem. B. A. Tews (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. med. vet. H. Voigt, Dr. rer. nat. D. Wienhold (Drittmittel)

Volontäre:

C. Arzt, C. Dröbner, C. Fuchs, A. Grabowska, K. Hills, R. Krüger, Y. Küster, K. Lacey, T. Lehr, P. Marx-Stöltzing, K. Müller, Tierärztin C. Nagler, T. Richter, C. Seeger, M. Scheible, M. Schöffler, P. Schöffler, E. Stechemesser, Z.-X. Yan

Forschung und behördliche Aufgaben:

In die Zuständigkeit des **Instituts für Immunologie** fallen ein Teil der amtlichen und behördlichen Aufgaben des IfI wie die Diagnose exotischer Tierseuchen, Untersuchungen im Rahmen der Einfuhr und Ausfuhr von Tieren und tierischen Produkten sowie die Zulassung von Impfstoffen und Diagnostika nach der Tierimpfstoff-Verordnung für bestimmte Tierseuchen sowie Stellungnahme zur Gentechnik. 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. Die immunologischen Arbeiten des Instituts dienen der Aufklärung der zellulären und humoralen Immunantwort nach Virusinfektionen. 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 und 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:

Dr. med. vet. D. Beier, Dr. rer. nat. A. Fröhlich, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. L. Geue, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. K. Henning, Dr. med. vet. K. Kroschewski (bis 08/05), Dipl.-Ing. A. Micklich, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. T. Müller, Dr. med. vet. C.J. Pötzsch (Drittmittel, bis 11/2005), Dr. rer. nat. C. Pottgießer (Drittmittel), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. G. Schares, Wiss. Oberrat PD Dr. agr. T. Selhorst, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. C. Staubach, Wiss. Oberrätin Dr. med. vet. K. Tackmann (bis 09/2005), Dr. agr. J. Teuffert, PD Dr. rer. nat. R. Ulrich, Dr. med. vet. Fred Unger, J. Vesely (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin K. Wiedl (Drittmittel), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. M. Ziller

Volontäre:

M. Zimmermann, C. Freuling, M. Granzow, J. Meyer, J. Schmidt, Dr. Kirsten Tackmann

Forschung und behördliche Aufgaben:

Das **Institut für Epidemiologie** beschäftigt sich mit der Epidemiologie einheimischer Tierseuchen (z.B. BSE, Klassische Schweinepest, Tollwut), der Prävention nicht einheimischer Infektionskrankheiten (Risikobewertungen, Frühwarnsysteme) und den biomathematische und epidemiologische 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 31.12.2005

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler				Angestellte (ohne Verwaltungspersonal)				Arbeiter				Verwaltungs- personal	Gesamt
	a	b	c	ges.	a	b	c	ges.	a	b	c	ges.		
<u>Insel Riems</u>														
1. Leitung u. zentrale Dienste einschließlich Zulassungsstelle	8			8	4,5	2		6,5					2	16,5
2. Institut für Molekularbiologie	11	4	0,5	15,5	14		14	2				2		31,5
3. Institut für Virusdiagnostik	11	4		15	11	4	15	2				2		32
4. Institut für Infektionsmedizin	15	4		19	14		14	3	1			4		37
5. Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger	7	5,5		12,5	6	4	10	1	1			2		24,5
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
<u>Tübingen</u>														
1. Sekretariat													1	1
2. Institut für Immunologie	9	8		17	14	1	15	5				5		37
3. Gemeinsch. Einrichtungen														
a) Informationszentrum					2		2							2
b) Bibliothek					1		1							1
c) Werkstätten					2		2	13				13		15
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
<u>Wusterhausen</u>														
1. Sekretariat													2	2
2. Institut für Epidemiologie	18	2		20	12,5	1	13,5							33,5
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

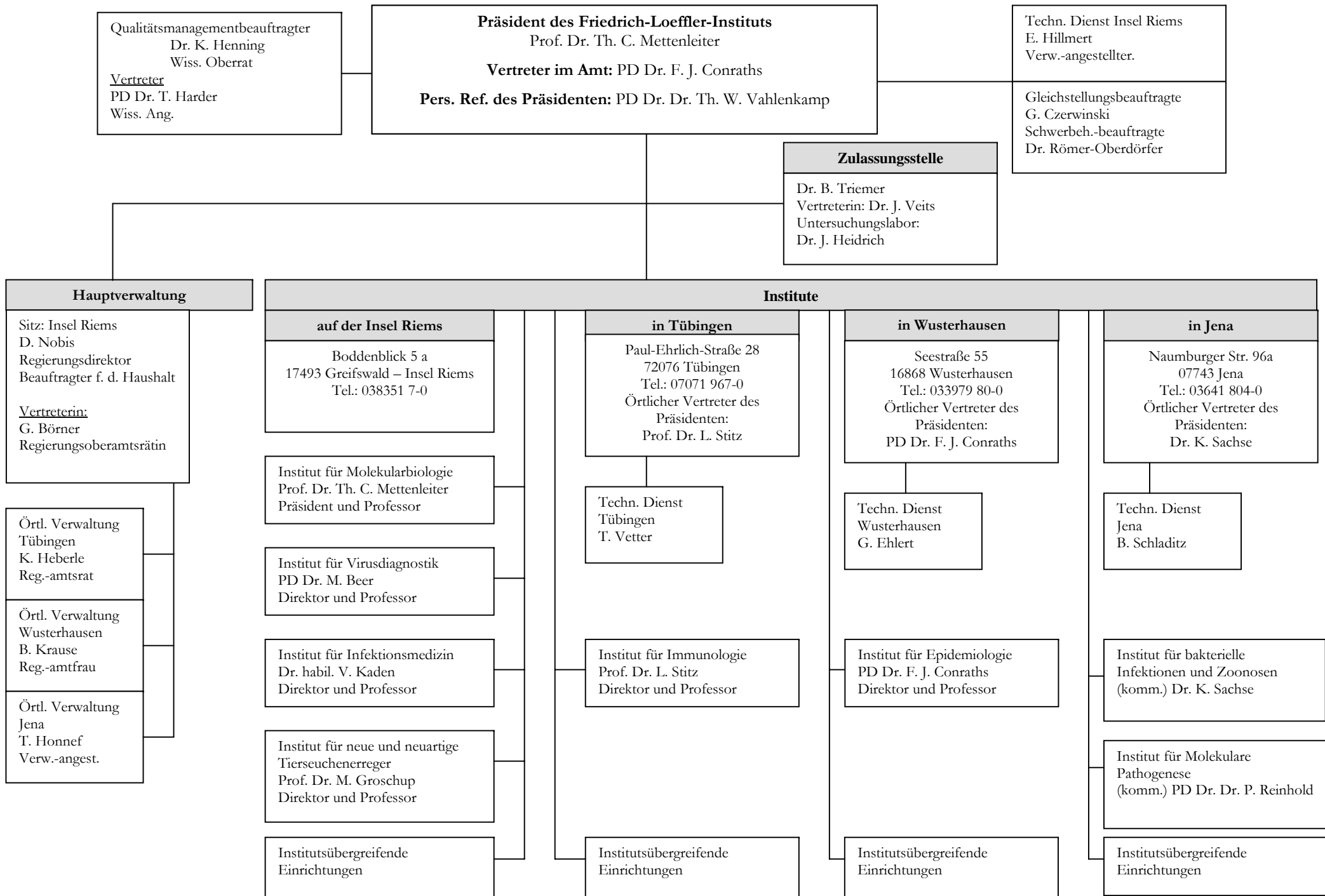
c) = aus DFG-Mitteln

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler			Angestellte (ohne Verwaltungspersonal)				Arbeiter			Verwalt. personal	Gesamt	
	a	b	c	ges.	a	b	c	ges.	a	b			c
Jena													
1. Sekretariat												2	2
2. Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen	15	3		18	16,75	0,5		17,375	4			4	39,375
3. Institut für molekulare Pathogenese	14	0,5		14,5	21,5	0,5		22	1			1	37,5
4. Gemeinsch. Einrichtungen													
a) Informationszentrum	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					1
5. Betriebstechnischer Dienst					1			1	6			6	7
6. Örtliche Verwaltung									4			4	5
Gesamt	109	31	0,5	140,5	146,375	13	0	159,375	144	2	0	146	495,125

a) = aus Hausmitteln

b) = aus Zuwendung Dritter und von Bundesbehörden

c) = aus DFG-Mitteln



III. AUSGEWÄHLTE SCHWERPUNKTTHEMEN

Institut für Molekularbiologie:

In virale Membranglykoproteine integrierte, nach Spaltung durch Furin freigesetzte Proteine: Ein neuartiger Ansatz zur Expression und Sekretion biologisch aktiver Polypeptide

Keil, G.* und Höhle, C.

Die Proproteinconvertase Furin, eine dem Subtilisin ähnliche Endoprotease, ist eine allgegenwärtige Protease, die Vorläuferproteine im sekretorischen Transportweg nach der Konsensussequenz –Arginin-X-Lysin oder Arginin-Arginin (R-X-K/R-R) spaltet. X steht dabei für eine beliebige Aminosäure. Furin ist hauptsächlich im *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) lokalisiert, befindet sich aber auch auf der Zelloberfläche, auf der es mit Filamin verbunden ist. Die Spaltung von Vorläuferproteinen durch Furin erfüllt wichtige Funktionen in der Embryogenese und Homöostase und spielt eine bedeutende Rolle bei Erkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit, bei der Tumorentwicklung sowie bei bakteriellen und viralen Infektionen wie Milzbrand und Ebola (Nakayama, 1997; Thomas, 2002). Glykoproteine einer Vielzahl von pathogenen Viren wie das Hämagglutinin von Influenzaviren, Glykoprotein (gp) 160 des humanen Immunschwäche-Virus (HIV) und das Fusionsprotein F des respiratorischen Synzytialvirus (RSV), einem Paramyxovirus, müssen nach der Konsensussequenz R-X-K/R-R gespalten werden, um fusionsaktiv zu werden und Infektiosität vermitteln zu können. Nach Spaltung bleiben die amino-terminale Untereinheit (NH₂-Untereinheit) und die carboxy-terminale Untereinheit (COOH-Untereinheit) über Disulfidbrücken miteinander verbunden.

Unter den durch Furin gespaltenen viralen Fusionsproteinen besitzen die F-Proteine des humanen und bovinen RSV eine bislang einzigartige Eigenschaft. Die Vorläuferproteine beider Viren werden zweimal durch Furin gespalten, was zu der Freisetzung von pep27, einem 27 Aminosäuren großen glykosylierten Peptid, führt (Abb. 2). Dieses wird von infizierten Zellen sezerniert (Zimmer et al., 2002).

In weiterführenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob das pep27 im BRSV F-Protein durch fremde Polypeptide oder biologisch aktive Proteine wie z.B. Zytokine ersetzt werden kann, um so heterologe Proteine mit dem F-Protein Vorläufer in das TGN zu transportieren (Abb. 1). Nach der dort erfolgten Spaltung durch Furin würde dann das fremde Protein durch sekretorische Vesikel aus der Zelle ausgeschleust werden. Diesem Gedanken zufolge bliebe das F-Protein strukturell und funktionell identisch der Wildtyp-Form in Membranen verankert. Dieses Verfahren kann möglicherweise immun-stimulatorische Moleküle mittels rekombinanter Viren gezielt am Ort der Virusvermehrung zur Expression bringen. Voraussetzung für diese Anwendung ist, dass pep27 für den intrazellulären Transport und die Funktion von F nicht notwendig ist und dass die Insertion einer fremden Aminosäuresequenz außerdem nicht mit der für die Aktivität von F notwendigen Strukturausbildung im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat interferiert.

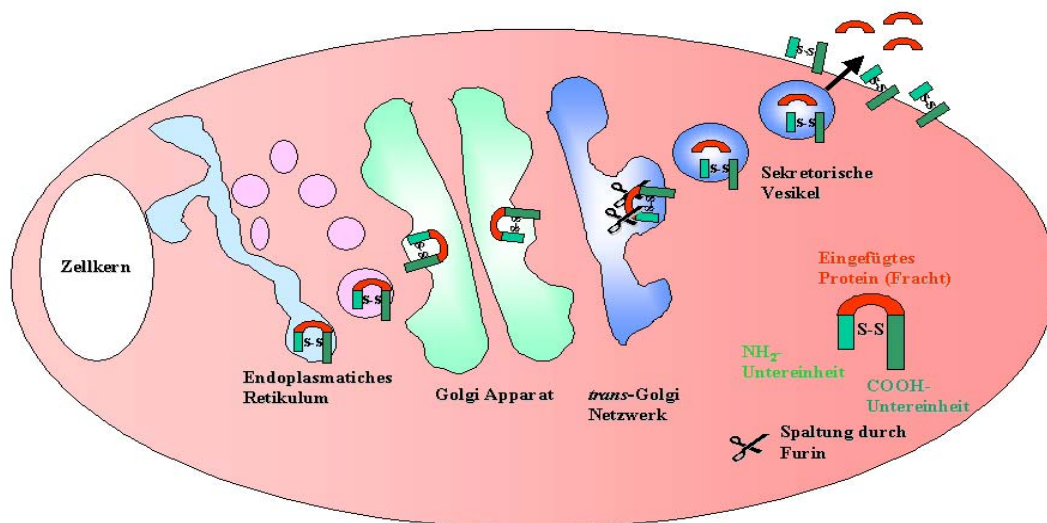


Abb. 1: Schema des intrazellulären Transportes von Membranproteinen mit darin integrierten, durch Spaltung mit Furin freisetzbaren Proteinen (Fracht).

Um diese Voraussetzungen zu überprüfen, wurden F-Proteine exprimierende Plasmide konstruiert, denen jedoch (I) pep27 und die zweite Furin-spaltstelle fehlt und (II) in denen pep27 durch bovines Interleukin 2 (boIL-2) bzw. bovines Interferon gamma (boIFN- γ) ersetzt worden war (Abb. 2).

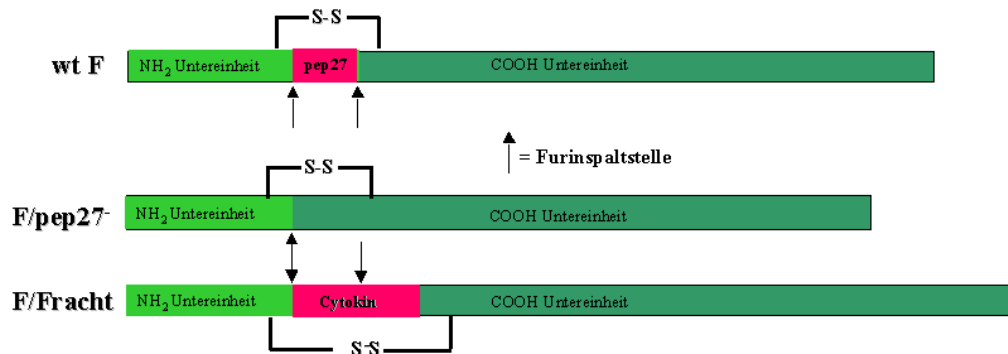


Abb. 2. Schematische Darstellung des BRSV Wildtyp (wt) F-Proteins, von F/pep27- und der F-Proteine mit eingefügtem Zytokin (F/Fracht). Furin-Spaltstellen sind durch Pfeile markiert. S-S deutet die Disulfidbrücken an, welche die NH₂- und COOH Untereinheiten miteinander verbinden.

Eine Eigenschaft des F-Proteins ist, dass exprimierende Zellen mit den benachbarten Zellen verschmelzen und Synzytien bilden, die mehr als 30 Zellkerne enthalten können. Nicht fusionsaktive Mutanten können dies nicht. Die Expression des Wildtyp F-Proteins und der mutierten Varianten in transfizierten Zellen ergab, dass pep27 die Zellfusionsaktivität unterstützt. Die Synzytien in Wildtyp F transfizierten Zellen waren deutlich größer (Abb. 3A) als diejenigen, die vom pep27-deletierten F-Protein hervorgerufen wurden (Abb. 3B). Im Gegensatz dazu inhibierte das Einfügen von boIL-2 und boIFN- γ die Zellfusionsaktivität des F-Proteins vollständig (Abb. 3 C und D). Analysen bezüglich Transport und Reifung der jeweiligen F-Proteinvarianten in transfizierten Zellen zeigten, dass keine großen Unterschiede zwischen Wildtyp und mutierten F-Proteinen bestanden. Die Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass biologisch aktive Zytokine in den Zellkulturüberstand abgegeben wurden (König et al., 2004).

Um zu klären, ob die verminderte bzw. fehlende Zellfusionsaktivität von F/pep27-, F/boIL-2 und F/boIFN- γ auch zum Verlust der Funktion für die Infektiosität führt, wurden die jeweiligen offenen Leserahmen verwendet, um infektiöses BRSV aus Plasmid-DNA zu generieren. Sowohl F/pep27- als auch F/boIL-2 ermöglichten die Isolierung von BRSV Mutanten, welche die jeweiligen F-Protein Varianten exprimierten. Alle Versuche, BRSV Isolate zu erhalten, die F/boIFN- γ exprimierten, waren dagegen erfolglos. Diese Ergebnisse zeigten, dass pep27 auch nicht notwendig für die Infektiosität von BRSV ist und dass die Aminosäuresequenz des eingefügten Proteins die Aktivität des F-Proteins hinsichtlich Zell-Zell Fusion und Infektiosität beeinflusst. Etwas überraschend war, dass F/boIL-2, obwohl nicht mehr in der Lage Zell-Zell Fusion zu vermitteln, seine Funktion für die Infektion von Zellen durch BRSV beibehalten hat. Damit zeigten diese Versuche, dass es prinzipiell möglich ist, ein durch Furin freisetzbare fremdes Protein zwischen die NH₂- und COOH-Untereinheit des F-Proteins einzusetzen, ohne dadurch die Funktion des Fusionsproteins für die produktive Vermehrung von BRSV zu zerstören.

Um die Effizienz dieser Expressionsstrategie zu analysieren, wurden Zellen mit BRSV-F/boIL-2 infiziert und die Menge des sekretierten boIL-2 quantitativ mit der Menge verglichen, die in dem Überstand von Zellen detektiert wurde, die mit der bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) Rekombinanten BHV-1/boIL2 infiziert worden waren. BHV-1/boIL2 enthält eine Expressionskassette, in der ein starker viraler Promotor die boIL-2 Synthese steuert (Kühnle et al., 1996).

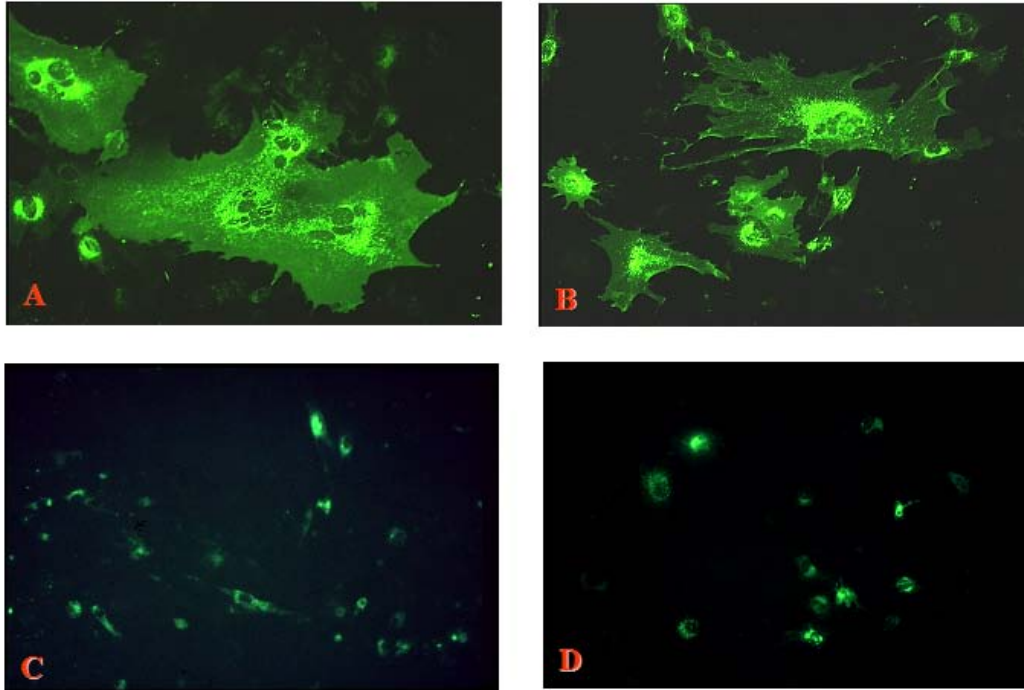


Abb. 3. Expression von Wildtyp F (A), F/pep27⁻ (B), F/boIL-2 (C) F/boIFN- γ (D) in Pharynxzellen vom Rind. Die F-Proteine wurden durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem F-spezifischen monoklonalen Antikörper sichtbar gemacht.

Der Vergleich ergab, dass die Synthese von boIL-2 durch BRSV-F/boIL-2 deutlich geringer war als die Menge, die durch Infektion mit BHV-1/boIL-2 erzielt wurde. Dies beruht wahrscheinlich hauptsächlich auf den biologischen Unterschieden zwischen den beiden Viren. BRSV wächst bedeutend langsamer und produziert *in vitro* und *in vivo* erheblich niedrigere Virustiter als BHV-1. Das ist verbunden mit niedrigeren Expressionsraten der viralen Gene. Die im Vergleich zu BHV-1 relativ geringe Proteinsynthese muss jedoch nicht unbedingt ein Nachteil für ein virales Expressionssystem sein, insbesondere unter Umständen, in denen hohe Expressionsraten von z.B. immunmodulatorischen Proteinen oder antientzündlich wirksamen Polypeptiden unerwünschte Nebeneffekte zeigen.

Da alle anderen bekannten durch Furin prozessierten viralen Membranglykoproteine nur einmal gespalten werden, wurde in folgenden Experimenten versucht, das Prinzip des Transportes und der Sekretion von durch Furin freisetzbaren integrierten Proteinen auch auf Membranproteine von Viren mit effizienterer Replikation zu übertragen. Hierfür wurden neben der originären Furinspaltstelle zusätzlich ein Protein sowie eine zweite Spaltstelle eingefügt. Als Vektor wurde BHV-1 ausgewählt, dessen Glykoprotein B (gB) eines der vorherrschenden Proteine in der Virushülle ist und das in infizierten Zellen zu den am stärksten exprimierten Proteinen zählt. BHV-1 ist ein α -Herpesvirus, das in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung erhebliche wirtschaftliche Verluste verursacht. BHV-1 repliziert sowohl in Zellkultur als auch im infizierten Tier schnell und zu hohen Titern. Zur Bekämpfung von BHV-1-bedingten Erkrankungen wird weltweit geimpft. Da die hier beschriebene Strategie auch der Verbesserung der vorhandenen Impfstoffe dienen könnte, wurde als Ausgangsvirus ein zugelassener Lebendimpfstoffstamm verwendet.

Das gB von BHV-1 ist ein essentielles Membranglykoprotein, welches für die Penetration in die Wirtszelle und die direkte Ausbreitung von Zelle zu Zelle benötigt wird. Wildtyp gB wird kotranslational in das endoplasmatische Retikulum transportiert und durch N-Glykane modifiziert. Dieses Vorläuferprotein (pgB) mit einer molekularen Masse von ca. 117 Kilodalton (kDa) wird in den Golgi Apparat transportiert. Dort werden O-verknüpfte Kohlenhydratseitenketten angehängt, was zur Bildung des 130 kDa gB führt. Dieses wird im TGN weiter transportiert und durch Furin in die 72 kDa NH₂-Untereinheit und die 55 kDa COOH-Untereinheit gespalten, die durch Disulfidbrücken kovalent verbunden bleiben (siehe Abb. 4 und 6).

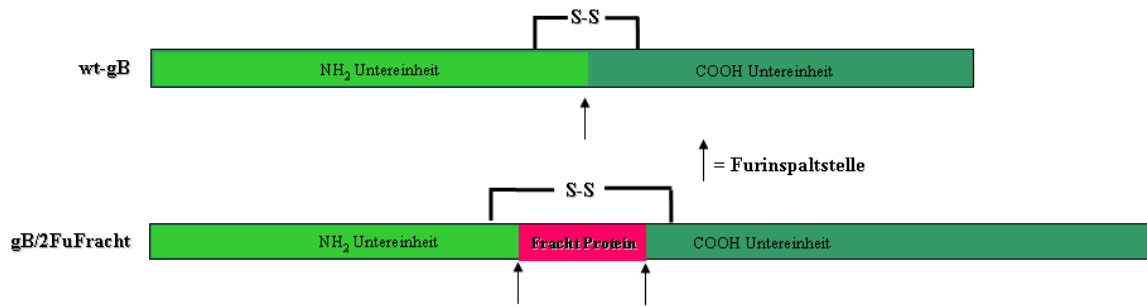


Abb. 4. Schematische Darstellung von BHV-1 Wildtyp gB (wt-gB) und gB, das zwei Furinspaltstellen enthält, die das Frachtprotein flankieren. S-S deutet die Disulfidbrücken an, welche die NH₂- und COOH-Untereinheiten verbinden. Pfeile markieren die Furinspaltstellen.

Um zu testen, ob es grundsätzlich möglich ist, gB als Transporter zu verwenden, wurde zunächst das 246 Aminosäuren große "*green fluorescent protein*" (GFP) zur Integration ausgewählt. Auf Grund der GFP-Autofluoreszenz kann Proteinexpression und die Isolierung von rekombinantem BHV-1 leicht verfolgt werden (Abbildung 5).

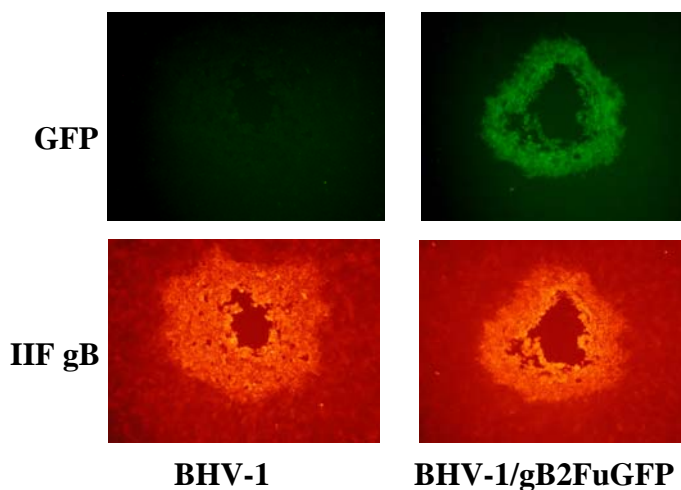


Abb. 5. Autofluoreszierende Zellen in von BHV-1 oder BHV-1/gB2FuGFP induzierten Plaques (grüne Fluoreszenz). Die Zellen wurden zur Kontrolle durch indirekte Immunfluoreszenz (rote Fluoreszenz) mit einem gB-spezifischen monoklonalen Antikörper gefärbt (IIF gB).

Die Bestimmung der Zellkulturcharakteristika des Isolates BHV-1/gB2FuGFP im Vergleich zu dessen Ausgangsstamm ergab keine erheblichen Unterschiede bei der Penetration in die Wirtszelle, bei der direkten Ausbreitung von Zelle zu Zelle und bei der Virusproduktion. Die Analyse der intrazellulären Reifung ergab, dass der Transport von gB2FuGFP in das TGN mit dem des Wildtyp gB vergleichbar war und dass das GFP vollständig aus gB freigesetzt und in das Zellkulturmedium sezerniert wurde.

Um ein immunologisch relevantes Protein in gB zu exprimieren und die Expressionsraten zwischen dem gB-Transporter Ansatz und einem von einer Expressionskassette durch BHV-1 exprimierten Protein zu vergleichen, wurde boIL-2 in das gB integriert und damit die Rekombinante BHV-1/gB2FuIL2 hergestellt. Der Vergleich des intrazellulären Transports ergab eine leichte Verzögerung der Reifung von gB2FuIL2 gegenüber gB von BHV-1/boIL-2, welches sich in dem späteren Auftreten der NH₂- und COOH Untereinheiten und der länger anhaltenden Präsenz ungespaltenen gBs in pulse/chase-Experimenten widerspiegelte (Abb. 6A). Dennoch waren die Zellkulturcharakteristika mit dem Ausgangsstamm und der rekombinanten BHV-1/boIL-2 vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass die Verzögerung im Transport nicht wesentlich mit der Virusvermehrung interferiert.

Die Untersuchung der boIL-2 Mengen im Kulturüberstand von Zellen, die mit den Rekombinanten infiziert worden waren, legt nahe, dass im Vergleich zu BHV-1/boIL-2-infizierten Zellen BHV-1/gB2FuIL-2-infizierte Zellen mehr boIL-2 sekretierten (Abb. 6B). Bei Verwendung von gB als Transporter wird demnach zumindest ebensoviel boIL-2 sezerniert wie durch Synthese von einer Expressionskassette erreichbar ist.

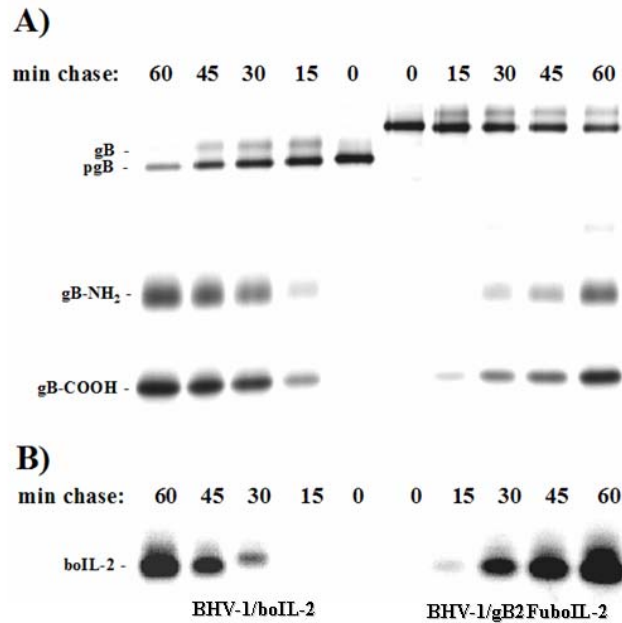


Abb. 6. Intrazellulärer Transport von gB und gB/2FuIL-2 und Sekretion von boIL-2 in das Kulturmedium nach Infektion mit BHV-1/boIL-2 und BHV-1/gB2FuIL-2. Die Proteine infizierter Zellen wurden mit radioaktiven Aminosäuren für 30 Minuten markiert (pulse) und für die angegebenen Zeiten nach Entfernen der markierten Aminosäuren weiter inkubiert (chase). Die intrazellulären gB Formen (A) und extrazelluläres boIL-2 wurden immunopräzipitiert und durch Fluorescence Imaging sichtbar gemacht.

Unmittelbar nach der Markierung (0) sind in den Zellen nur Vorläuferproteine (pgB) nachweisbar, von denen bereits nach 15 Minuten ein Teil als ungespaltenes gB vorliegt. Zeitgleich treten auch die NH₂- und COOH-Untereinheiten auf. Im Gegensatz zu gB von BHV-1/boIL-2, das nach 60 min nur in der gespaltenen Form vorliegt, finden sich bei gB2FuIL-2 noch deutliche Anteile an ungespaltenem gB.

Die Kinetik der Sekretion von boIL-2 verläuft bei gB2FuIL-2 parallel mit dem Auftreten der Untereinheiten, während in BHV-1/boIL-2-infizierten Zellen boIL-2 erst später nachweisbar wird.

Um neben boIL-2, das für die adaptive Immunantwort von Bedeutung ist, ein für die angeborene Immunantwort wichtiges Protein in gB verpackt zur Expression zu bringen, wurde bovines Interferon alpha (IFN- α) als herausspaltbares Protein in gB integriert. Auch gB2FuIFN- α erwies sich als funktionell und führte zur Isolierung der Rekombinanten BHV-1/gB2FuIFN- α . Im Gegensatz zu gB2FuGFP und gB2FuIL-2 wurde gB2FuIFN- α nur sehr ineffizient an der Spaltstelle zwischen NH₂-Untereinheit und boIFN- α gespalten. Das führte zu der Entstehung eines 90 kDa Fusionspolypeptides aus der NH₂ Untereinheit und boIFN- α , das auch in Virionen inkorporiert wurde (Abb. 7).

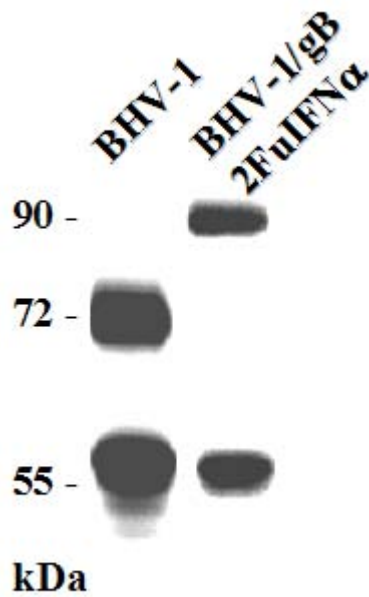


Abb. 7. Einbau des 90 kDa Fusionspolypeptides zwischen boIFN- γ und der NH₂-Untereinheit in BHV-1/gB2FuIFN α Viruspartikel. Darstellung der gB Proteine aus gereinigten Virionen nach Immunpräzipitation.

BHV-1/gB2FuIFN- α Virionen sind sehr empfindlich gegenüber Neutralisierung durch Antikörper gegen boIFN- α und den von Vaccinia-Virus kodierten IFN- α Rezeptor Antagonisten B18R. Dies lässt darauf schließen, dass boIFN- α frei auf der Oberfläche von Virionen zugänglich ist. Diese Interpretation wird durch die Bestimmung der Penetrationsgeschwindigkeit von BHV-1/gB2FuIFN- α Virionen in Zielzellen unterstützt. Diese ergab eine im Vergleich zu dem Ausgangsstamm oder zu BHV-1/gB2FuIL2 schnellere Penetration (Abb. 8).

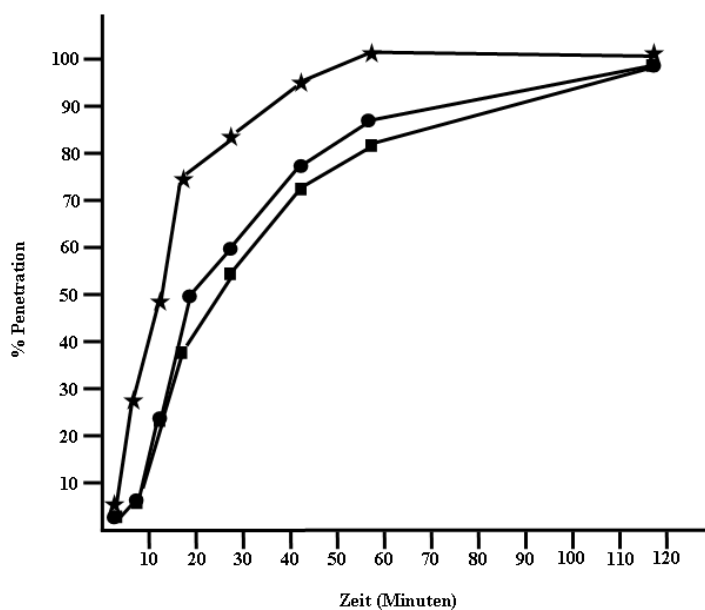


Abb. 8. Beschleunigte Penetration von BHV-1/gB2FuIFN- α (Sternchen) im Vergleich zu BHV-1/gB2FuIL-2 (Kreise) und dem BHV-1 Ausgangsstamm (Quadrate).

Wir nehmen an, dass der beschleunigte Eintritt in die Zelle auf der Interaktion zwischen dem an gB gebundenen boIFN- α und Typ I Interferon-Rezeptoren auf der Zelloberfläche beruht. Dies könnte einen engeren Kontakt zwischen Virionen und Zelle vermitteln und so die Membranfusionsvorgänge beschleunigen, die letztlich zum Entlassen des Nukleokapsides in das Zytoplasma führen. Wenn sich die Annahme bestätigt, dass an den Carboxyterminus der NH₂-Untereinheit von gB fusionierte Proteine frei zugänglich sind und ihre funktionellen Eigenschaften behalten, könnte sich daraus eine weitere Anwendung für das Transporter-Fremdprotein-Prinzip ergeben. Sollte es möglich sein, BHV-1 Rekombinanten mit an die gB-NH₂-Untereinheit fusionierten spezifischen Liganden zu konstruieren, die mit Signalosomen interagieren können, wäre ein Verfahren verfügbar, das sowohl selbst replizierend als auch nicht infektiös eingesetzt werden könnte. Anwendungsmöglichkeiten wären zum Beispiel, die Wanderung von Immunzellen bei Entzündungsreaktionen zu beeinflussen oder in Tumorzellen durch "Death" Rezeptoren vermittelte Apoptose zu induzieren. Möglicherweise lassen sich die hier für BRSV F und BHV-1 gB beschriebenen Möglichkeiten auch auf durch Furin gespaltene Membranproteine anderer Viren oder auf zelluläre Proteine wie Matrix Metalloproteinasen oder α -Ketten von Integrinen übertragen. Nicht zuletzt könnte die Fusion von Antigenen an die NH₂-Untereinheit eine Möglichkeit sein, neuartige Lebend-Vektorimpfstoffe und/oder inaktivierte Vakzinen zu entwickeln, die dem Immunsystem Antigene sowohl mit der infizierten Zelle als auch durch die Virusnachkommenschaft präsentieren bzw. die aus gereinigten und inaktivierten Viruspartikeln mit hoher Antigendichte bestehen.

Literatur

Keil, G.M., C. Höhle, K. Giesow und P. König. 2005. Engineering glycoprotein B of bovine herpesvirus 1 to function as transporter for secreted proteins: a new protein expression approach. *J. Virol.* **79**:791-799.

König, P., K. Giesow, K. Schuldt, U. Buchholz und G.M. Keil. 2004. A novel protein expression strategy using recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV): modifications of the peptide sequence between the two furin cleavage sites of the BRSV fusion protein yield secreted proteins, but affect processing and function of the BRSV fusion protein. *J. Gen. Virol.* **85**:1815-1824.

Kühnle, G., R.A. Collins, J.E. Scott, und G.M. Keil. 1996. Bovine interleukins 2 and 4 expressed in recombinant bovine herpesvirus 1 are biologically active secreted glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **77**:2231-2240.

Nakayama, K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a variety of precursor proteins. *J. Biochem.* **327**:625-635.

Thomas, G. 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:753-766.

Zimmer, G., K.K. Conzelmann und G. Herrler. 2002. Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture. *J. Virol.* **76**:9218-9224.

Zimmer, G., M. Rohn, G.P. McGregor, M. Schemann, K.K. Conzelmann und G. Herrler. 2003. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Biol. Chem.* **278**:46854-46861.

Institut für Virusdiagnostik:

Ringtests zur Labordiagnose anzeigepflichtiger Tierseuchen

Beer, M., Depner, K.*, Haas, B., Harder, T., Schirrneier, H., Starick, E., Staubach, C., Teifke, J.P., Werner, O. und Ziller, M.

Einleitung

Die Ringtests zur Labordiagnose anzeigepflichtiger Tierseuchen haben das Ziel, den Stand der Diagnostik bundesweit zu ermitteln bzw. auf hohem Niveau zu erhalten und ihn gegebenenfalls zu verbessern. Sie sind in erster Linie zur Kontrolle der eingesetzten Testverfahren, aber auch der Qualität ihrer Ausführung gedacht. Indirekt tragen die Ringtests auch zu einer besseren Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus verschiedenen Laboratorien bei. Sie widerspiegeln den qualitativen Stand der routinemäßig durchgeführten Diagnostik in den einzelnen Untersuchungseinrichtungen.

Im ein- bis zweijährigen Rhythmus verschicken die im Institut für Virusdiagnostik angesiedelten Nationalen Referenzlaboratorien für Schweinepest, Aviäre Influenza, Newcastle Disease, Bovine Virusdiarrhoe, Bovines Herpesvirus 1 sowie Maul- und Klauenseuche an die Untersuchungseinrichtungen der Länder einen Satz Referenzproben. Diese Proben, die zum Zwecke einer objektiven Vergleichsanalyse kodiert sind, werden dann in einem gewissen Zeitraum von den jeweiligen Laboratorien untersucht. Von Seiten der Referenzlabors gibt es in der Regel keine speziellen Vorschriften bezüglich der einzusetzenden Testverfahren oder Testprotokolle. Es sollten die in der jeweiligen Untersuchungseinrichtung üblichen Testverfahren nach den hausinternen Protokollen angewandt werden. Die Ringtestproben sollten in der Tagesroutine möglichst wie eine „normale“ Einsendung betrachtet und behandelt werden. Diese Vorgehensweise gewährleistet, dass die erzielten Ergebnisse ein wahrheitsgetreues Bild der Qualität der Diagnostik darstellen. Im Folgenden werden die verschiedenen Ringtests vorgestellt.

Klassische Schweinepest – Antikörper- und Erregernachweis im Serum

Seit 1994 werden jährlich Ringtests zur Diagnose der Klassischen Schweinepest (KSP-Ringtest) durchgeführt. Für den Antikörpernachweis sowie für den direkten Erregernachweis wird ein Satz von fünf Seren in lyophilisierter Form verschickt.

Die Seren sollten nach Möglichkeit in den folgenden Tests untersucht werden:

1. Neutralisationstest (NT) zur differentialdiagnostischen Abklärung bezüglich Pestiviren
2. Antikörper-ELISA
3. Zellkulturelle Virusisolierung mit Bestimmung des Virustiters
4. RT-PCR (falls Test vorhanden)

Die Besonderheit der KSP-Ringtests der letzten zwei Jahre war, dass es sich um "Echtzeit"-Ringtests gehandelt hat. Die Proben waren von einem "reellen" Vorbericht begleitet, in dem ein KSP-Verdacht geäußert wurde.

Um die objektivierte und vergleichbare Quantifizierung der Ringtestergebnisse innerhalb eines oder mehrerer Ringversuche zu ermöglichen, wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Epidemiologie in Wusterhausen eine mathematische Methode zur Bewertung der Ergebnisse entwickelt. Grundlage für diese Arbeit waren die Ergebnisse der Ringtests der Jahre 1999 bis 2003. In diesen fünf Ringtests wurden insgesamt 850 Testseren an 38 Untersuchungseinrichtungen verschickt. Dabei wurden pro Jahr aus einer Palette von 18 Seren jeweils fünf Testseren ausgewählt.

Grundlage der Evaluation ist ein Punktesystem beruhend auf einer Bewertungsmatrix, die den Schwierigkeitsgrad der verschickten Probe und den Laborbefund (richtig, falsch, fraglich) berücksichtigt (Tabelle 1). Das *Scoring* bei der Beurteilung der Proben verlief zwischen sehr schlecht (-3) und sehr gut (+3).

Tabelle 1: Bewertungsmatrix für die KSP-Ringversuche

Einstufung der Probe	Beurteilung der Probe durch das Labor		
	Richtig	Fraglich	Falsch
++	1	-2	-3
+	2	-1	-2
+/-	3	0	-1
-	2	-1	-2
--	1	-2	-3

- ++ Positive Probe, sehr leicht zu diagnostizieren
- + Positive Probe, leicht/mittelschwer zu diagnostizieren
- +/- Grenzwertige/problematische Probe, schwerer zu diagnostizieren
- Negative Probe
- Pestiviren-negative Seren (keine Antikörper gegen Pestiviren)

Für jedes über die Jahre versandte Testserum wurde vom Referenzlabor eine Einstufung der Probe in die unterschiedlichen Kategorien erstellt. Aus der Bewertungsmatrix ergeben sich für jede Probe die folgenden Informationen:

- A_i minimal erreichbare Punktzahl (bei falschem Laborbefund) für die Probe i
- B_i maximal erreichbare Punktzahl (bei richtigem Laborbefund) für die Probe i
- S_i erreichte Punktzahl (für den tatsächlichen Laborbefund) für die Probe i

Zur Normierung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die erreichte Gesamtpunktzahl in einen Prozentwert umgerechnet. Die Normierung erfolgte nach den Kriterien:

- Die maximal erreichbare Gesamtpunktzahl entspricht 100%.
- Die Gesamtpunktzahl bei 'zufälligen' Laborbefunden entspricht 0%. Es sollte nicht angenommen werden, dass tatsächliche Laborbefunde für eine Menge von Proben schlechter abschneiden als zufällig gewürfelte Befunde.

Tabelle 2 fasst die Ergebnisse aller Labors nach Jahren zusammen. Sie zeigt die erreichte Gesamtpunktzahl in Prozent, die in den jeweiligen Untersuchungseinrichtungen pro Jahr erreicht wurde.

Tabelle 2: Anzahl Labors stratifiziert nach der erreichten Gesamtpunktzahl in Prozent und dem Jahr des Ringversuchs

Jahr	Erreichte Gesamtpunktzahl in Prozent									Σ Labors
	-20	-10	10	20	30	40	60	70	100	
1999	0	0	0	2	1	3	2	13	10	31
2000	0	1	3	2	3	3	3	8	9	32
2001	0	0	1	0	3	1	7	15	6	33
2002	0	0	0	0	3	1	3	12	15	34
2003	1	0	0	0	0	3	1	8	18	31

Die hier vorgestellte Methode zur Bewertung von Ringversuchen versucht eine möglichst objektive und vergleichbare Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsämter. Die Bewertungsmatrix als Grundlage für die Ermittlung der Punktzahlen kann im Verlauf der Jahre weiter angepasst und standardisiert werden, um den Vergleich über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass in den meisten Einrichtungen korrekte Ergebnisse erzielt wurden. Bezüglich der Interpretation von Einzelergebnissen gab es in einigen Labors Abweichungen von dem erwarteten Ergebnis. Da die KSP-Diagnostik eine Bestandsdiagnostik und keine Einzeltierdiagnostik ist, sollte immer die Gesamtheit der Ergebnisse beurteilt werden. Das Bestandsurteil in allen Untersuchungseinrichtungen kann als sehr zufriedenstellend eingestuft werden. Trotz der limitierenden Faktoren (wenig Untersuchungsmaterial und kurze Untersuchungszeit) wurde in den letzten Jahren in keinem Labor eine falsche KSP-Diagnose (Bestandsdiagnose) gestellt. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass im Ernstfall deutschlandweit die richtige KSP-Diagnose gestellt worden wäre.

Für die Zukunft muss das Augenmerk auf handwerkliche Dinge und auf scheinbare Kleinigkeiten gerichtet werden (z.B. Verwechslungen von Proben zu vermeiden). Die PCR-Ergebnisse zeigen, dass diese Methode ergänzende Möglichkeiten der KSP-Diagnose bietet. Die Ergebnisse, die mit kommerziellen ELISAs erzielt wurden, können als gut bewertet werden. Besonders große Fortschritte wurden zudem in der serologischen Differentialdiagnostik erzielt.

Aviäre Influenza / Newcastle Disease

Hauptziel des Ringtestes aus dem NRL für AIV und NDV war es 2005 erstmalig, den Stand der Etablierung von RT-PCR-Tests zur Diagnostik von AIV zu ermitteln. Darüber hinaus waren aber auch Virusanzucht und Hämagglutinationshemmtest für die Subtypisierung der Proben gefordert. Um dem Anliegen AIV-RT-PCR gerecht zu werden, wurden diesmal nicht verschiedene AIV- und APMV-Isolate versandt, sondern als Ausgangsmaterial für sieben daraus hergestellte Tupferproben Verdünnungsstufen einer AIV-positiven Allantoisflüssigkeit (AF) sowie eine negative AF eingesetzt.

Am AIV-, APMV-Ringtest 2004 nahmen 21 Pflicht- und sieben freiwillige Teilnehmer teil. Damit waren insgesamt 196 Einzelproben in den Test einbezogen. Das Gesamtergebnis stellt sich wie folgt dar:

Teilnehmer	richtige Ergebnisse		falsche Ergebnisse	
	mit Subtyp	ohne/falscher Subtyp	falsch positiv	falsch negativ
Pflicht	128 (87,1%)	11 (7,5%)	2	6 (4,1%)
Freiwillig	36 (73,5%)	6 (12,2%)	1	6 (12,2%)
Gesamt	164 (83,7%)	17 (8,7%)	3 (1,5%)	12 (6,1%)

Von den 21 Pflichtteilnehmern diagnostizierten 15 (71,4%) alle Proben korrekt. In diese Zahl einbezogen sind zwei Einrichtungen, bei denen je einmal die Ermittlung des HA-Subtypes fehlt bzw. fraglich ist. An falsch positiven Ergebnissen traten lediglich in einem Amt der Befund „H7-positiv“ für die negative AF und in einem anderen Amt „PMV-1“ für die AF-Verdünnungsstufe 10^{-8} auf. In vier Untersuchungsämtern gab es falsch negative Ergebnisse: 2 x für die 10^{-4} -Verdünnungsstufe, 2 x für die Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} . Von den sieben freiwillig teilnehmenden Einrichtungen bewerteten zwei alle Proben richtig.

PCR-Tests

Siebzehn von 21 Pflichtteilnehmern und vier von sieben freiwilligen Teilnehmern setzten PCR-Tests zur Untersuchung der Ringtestproben ein. Vier Einrichtungen nutzten dafür ausschließlich *real-time* PCR-Methoden (RRT-PCR), und zwei Einrichtungen diese parallel zur RT-PCR. Insgesamt wurden vier verschiedene RRT-PCR- und sechs verschiedene RT-PCR-Protokolle zum Nachweis von AIV verwendet. An neun Einrichtungen ist außerdem die AIV-M-nested PCR etabliert. Sieben Einrichtungen wendeten PCR-Tests zur Subtypisierung H5 und/oder H7 an. Darüber hinaus wurden in dreizehn Einrichtungen PCR-Tests auch für die Untersuchung auf APMV-1 eingesetzt. Darauf wird hier nicht eingegangen. Die nachfolgende Auswertung der AIV-PCR-Tests basiert auf den Ergebnissen, die *nachweislich* aus Untersuchung von RNA aus den Originaltupferproben resultierten. Das betrifft 13 + 4 Einrichtungen. Von Einrichtung „I“ flossen RRT- und RT-PCR-Ergebnisse separat ein, so dass sich ein Einzelprobenumfang von 126 ergibt.

Teilnehmer	Probenzahl	richtig positiv	falsch negativ	falsch positiv
Pflicht-	98	77	20	1
freiwillig	28	25	3	0
gesamt	126	102	23	1

Bei den ausgewerteten Untersuchungen von dreizehn Pflichtteilnehmern gab es fünf Einrichtungen mit fehlerfreien Ergebnissen, in acht Einrichtungen traten falsch negative Ergebnisse auf (nach RRT-PCR in drei, nach RT-PCR in zwei, nach nested PCR in zwei Einrichtungen). Dabei sollten insbesondere negative Ergebnisse bei der 10^{-3} -verdünnten Probe (5 Einrichtungen) kritisch gewertet werden.

Virusisolierung

Alle 21 Pflichtteilnehmer und sechs der sieben freiwilligen Teilnehmer führten Virusisolierung auf vorbebrüteten Eiern und/oder auf Zellkulturen durch. Bei den Virussisolierungs-Versuchen auf Eiern gab es bei den Pflichtteilnehmer in zwei Einrichtungen falsch negative Ergebnisse, beide die 10^{-3} - und die 10^{-4} -Verdünnung betreffend. Den Ursachen dafür sollte nachgegangen werden. Sieben Einrichtungen arbeiteten mit Zellkulturen. Nur in einem Amt wurden mittels Zellkultur alle Proben richtig detektiert. In einem Fall sind die Ergebnisse Zellkultur/Ei nicht einzeln ausgewiesen, und in fünf Einrichtungen traten insgesamt neun falsch negative Ergebnisse auf. Das unterstreicht erneut, dass in fast allen Einrichtungen der AIV-Nachweis mittels Zellkulturen nicht mit der erforderlichen Sensitivität zu führen war. Es wird daher mit Nachdruck empfohlen, diese Methode nicht als Standardmethode einzusetzen.

Maul- und Klauenseuche

Angesichts der heute im MKS-Ausbruchsfall geforderten Durchsätze bei serologischen Untersuchungen müssen Proben aus symptomfreien Beständen in den Untersuchungseinrichtungen der Länder geprüft werden. Hierfür steht inzwischen ein zugelassener ELISA zur Verfügung (Ceditest FMDV-NS der Firma Cedi-Diagnostics). Den Ländern wurde ein von der EUFMD Research Group verabschiedeter Entwurf einer Vorschrift zur veterinärhygienischen Absicherung der beteiligten regionalen Untersuchungseinrichtungen im Ausbruchsfall übermittelt. Es handelt sich um Maßnahmen, die keine baulichen Veränderungen (z.B. Unterdruck und Abluftfilterung) erfordern. Alle Untersuchungen von Proben aus Beständen mit klinischen Symptomen, welche einen MKS-Verdacht begründen, sowie alle serologischen Abklärungsuntersuchungen mittels Neutralisationstest müssen selbstverständlich weiterhin am FLI erfolgen.

Nachdem das FLI über das BMELV die Obersten Landesbehörden um Benennung von Veterinäruntersuchungsämtern für die MKS-Serologie gebeten hatte, forderten zwanzig Untersuchungseinrichtungen aus fünfzehn Bundesländern Testseren an. Das FLI versandte an die Teilnehmer des Ringtests Seren, welche in unterschiedlicher Menge Antikörper gegen Serotyp-übergreifende Nichtstrukturproteine des MKSV enthalten (sechs positive, ein grenzwertiges und ein negatives Serum). Diese Seren waren am FLI zuvor mit negativem Ergebnis auf MKS-Virus geprüft und zusätzlich hitzebehandelt worden. Die Untersuchungsämter wurden gebeten, auf den nicht benötigten *Wells* der ELISA-Platten negative Seren von Klautieren aus dem normalen Probenanfall zu untersuchen.

Es gingen Ergebnisse von zwanzig Untersuchungseinrichtungen ein. In zwei Fällen wurden die Ergebnisse nicht als prozentuale Hemmwerte übermittelt und waren auch nicht oder nur teilweise in dieses Format überführbar; in diesen Fällen war aber die qualitative Abschätzung möglich, dass eine quantitative Auswertung nicht zu wesentlichen Änderungen in der Beurteilung geführt hätte.

Alle Teilnehmer haben die vom FLI versandten Seren richtig klassifiziert. Das grenzwertig eingestellte Serum wurde meist als m.o.w. schwach positiv klassifiziert, eine negative Einstufung aber nicht als Fehler gewertet. Bei einem Teilnehmer weichen die Hemmwerte jedoch vom Durchschnitt so stark ab, dass hier zu prüfen ist, ob die Seren korrekt rekonstituiert wurden und der Test exakt nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt wurde.

Betrachtet man die Gesamtheit der als Hemmwert vorliegenden Ergebnisse für die versandten Seren und die beiden internen Kontrollseren, so liegen die Standardabweichungen meist unter 10% des durchschnittlichen Hemmwertes. Ausnahmen bilden nur das negative und das grenzwertige Serum.

Bei der Untersuchung von 1.578 negativen Feldproben wurde eine Gesamt-Spezifität von 98,99% ermittelt. Mit Plasma (n = 572) und Serum (n = 696) ergaben sich nahezu identische Spezifitätswerte von 99,3 bzw. 98,3 %. Die restlichen 310 Ergebnisse konnten hinsichtlich der Probenart nicht zugeordnet werden. Auch hinsichtlich der Spezies war kein wesentlicher Unterschied feststellbar: (Rind [n = 881] 98,86%, Schaf [n = 184] 98,91, Ziege [n = 138] 100%, Schwein [n = 374] 98,93%; ein Serum stammte vom Dromedar). Dies zeigt, dass der Test spezifisch, stabil und gut reproduzierbar ist. Jedoch sollten in Zusammenarbeit mit dem Hersteller noch einige praktische Verbesserungen vorgenommen werden. Bei der Diskussion mit Teilnehmern und der Abklärung falsch positiver Proben bestätigte sich erneut, dass die Proben frei von partikulären Verunreinigungen sein müssen. Erneutes Zentrifugieren, Einfrieren und eine Inaktivierung für 30 Minuten bei 56 °C ist unschädlich und beseitigt oftmals die unspezifischen Reaktionen.

Erfahrungen aus den Ringvergleichen des OIE und Nationalen Referenzlabors für BHV-1 (NRL BHV-1)

In den bisherigen Ringvergleichen des NRL für BHV-1 in den Jahren 2001, 2003 und 2005 wurden alle gängigen Untersuchungsmethoden zum Nachweis von BHV-1-Antikörpern (markerunabhängige und markerabhängige Diagnostik) einbezogen. In erster Linie sollten die in der „Laborroutine“ eingesetzten Methoden zur Anwendung kommen: indirekte ELISA-Systeme, *blocking* ELISAs zum Nachweis von gB- sowie von gE-spezifischen Antikörpern, aber auch der klassische Neutralisationstest (NT). Mehr als 35 Untersuchungsstellen haben jeweils an den BHV-1-Ringtests teilgenommen, wobei sich in erster Linie staatliche Stellen, aber auch universitäre Einrichtungen oder Testhersteller darunter befunden haben. Im Jahr 2003 und vermehrt auch 2005 haben sich zudem Labore des europäischen Auslandes am deutschen BHV-1-Ringtest beteiligt (Referenzlabore der Schweiz, Österreichs und Hollands sowie Untersuchungseinrichtungen in Italien und Frankreich).

Zunächst ist festzustellen, dass der Qualitätsstandard aller am Ringvergleich beteiligten Untersuchungsstellen bei der Verwendung von kommerziellen ELISA-Systemen als sehr hoch einzuschätzen ist. Gleiche Testkits bzw. Testchargen haben bei den verschiedenen Anwendern sehr ähnlich reagiert. Die höchste Sensitivität für Serumproben erreichten in den Ringvergleichen immer die BHV-1-Antikörpernachweise mit gB-*Blocking*-ELISAs (bis zu 100% je nach Testsystem) sowie mit indirekten ELISA-Systemen (bis > 90%) (Abb. 1). Mit diesen Tests wurden zudem sehr geringe Unterschiede sowohl von Labor zu Labor als auch zwischen einzelnen Testchargen beobachtet. Erfreulicherweise wurden in keinem Fall die negativen Kontrollseren (falsch) positiv detektiert. Sowohl die im Ringvergleich verwendeten gB-*Blocking*-ELISAs als auch die indirekten BHV-1-Antikörper-Tests der verschiedenen Hersteller reagierten bei allen Ringvergleichen sehr ähnlich und reproduzierbar. Im Gegensatz hierzu wurden zum Teil große Schwankungen bei der Anwendung des BHV-1-Neutralisationstests beobachtet. Bei großer Streuung der Ergebnisse (zwischen 45% und 100% richtig bewertete Proben) fallen noch die z.T. erheblichen Titerunterschiede für ein und dieselbe Probe auf. Allerdings liegt die Leistungsfähigkeit des Neutralisationstests in vielen Untersuchungsstellen im Bereich der indirekten BHV-1-Antikörper-ELISAs. Da einige Untersucher entgegen den Empfehlungen jedoch immer noch mit einer kurzen (1-3 h) Serum-Virus-Inkubation gearbeitet haben, konnte die Beobachtung der höheren Sensitivität bei längerer Serum-Virus-Inkubation erneut bestätigt werden. Es wird daher nochmals daraufhin gewiesen, dass für einen möglichst sensitiven BHV-1-Neutralisationstest längere Serum-Virus-Inkubationszeiten (>12 h) Verwendung finden sollten. Einzelheiten zum BHV-1-Neutralisationstest finden sich zudem in den „Arbeitsanleitungen zur Labordiagnostik von anzeigepflichtigen Tierseuchen“ oder können beim NRL BHV-1 angefordert werden.

Die guten Eigenschaften der markerunabhängigen Testsysteme konnten nur zum Teil bei den Markertests angetroffen werden. Die gE-*Blocking*-ELISA Systeme reagierten mit den Ringvergleichsproben weniger sensitiv als die markerunabhängigen ELISAs, wobei keine sehr großen Unterschiede zwischen den Testsystemen der verschiedenen Hersteller festzustellen waren. Der mittlere Anteil richtig bewerteter Proben des Ringtestpanels lag für die gE-Antikörper-Systeme mit etwa 59% - 75% insgesamt deutlich unterhalb der Ergebnisse der markerunabhängigen ELISAs (gB-*Blocking*-ELISAs: ca. 90% - 100%; indirekte ELISAs: ca. 85% - 90%). In einigen Untersuchungsstellen wurden allerdings positive Proben (z.B. R1) nicht richtig

detektiert. Für den optimalen Einsatz der gE-*Blocking*-ELISAs ist daher eine genaue Prüfung der Systeme vor und während der Anwendung (Chargenprüfung, eigene interne Standardproben, Validierung im Automaten) ebenso unerlässlich wie die kritische Beurteilung der Ergebnisse (Testwiederholung, Bestätigungsproben, epidemiologische Plausibilitätsprüfung).

Für die Untersuchung von (Sammel-) Milchproben sind derzeit nur die dafür zugelassenen indirekten ELISA-Systeme geeignet. Derzeit steht kein sensitives und spezifisches BHV-1-Markertestsystem für (Sammel-) Milchproben zur Verfügung. Dies konnte durch die Ringtestergebnisse 2001 und 2005 bestätigt werden.

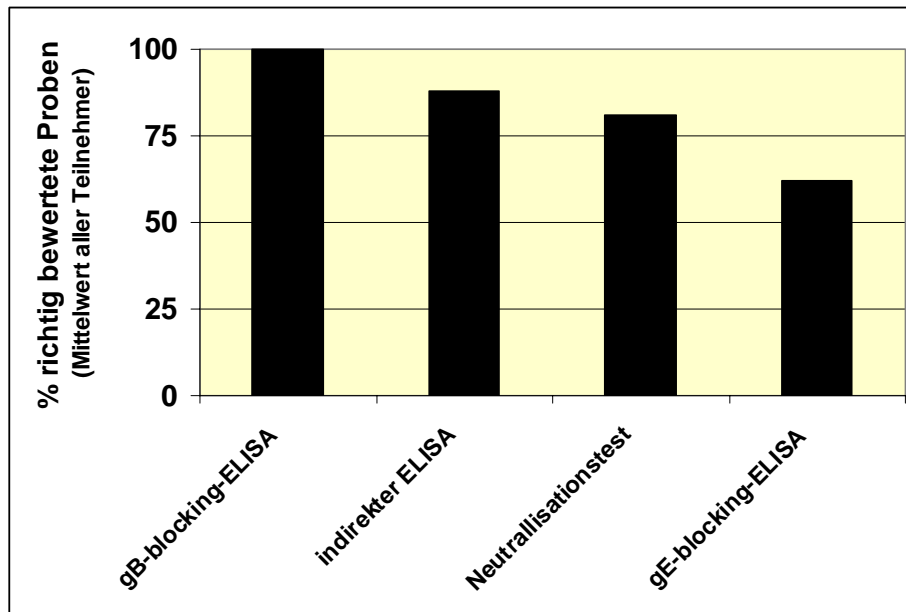


Abbildung 1: Ergebnisse des BHV-1-Ringtests 2005. Dargestellt sind jeweils die Werte für das beste Testsystem einer Kategorie.

Die aus den BHV-1-Ringtests möglichen Schlussfolgerungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Der Qualitätsstandard der Untersuchungseinrichtungen ist hoch. Die Maßnahmen sollten darauf zielen, diesen Standard zu halten.
- Die meisten markerunabhängigen Testsysteme (gB-*Blocking*-ELISAs, indirekte ELISAs) sind sehr sensitiv und robust. In allen Ringvergleichen wurde die höchste Sensitivität mit gB-*Blocking*-ELISAs erreicht. Aufgrund der Erfahrungen aus den Jahren 2001 bis 2005 sollte der BHV-1-gB-ELISA als „Goldstandard“ bezüglich der Sensitivität angesehen werden. Die Leistungsfähigkeit des NT liegt im Bereich der indirekten ELISAs. Er hat besonders als „ELISA-unabhängiger“ Bestätigungstest Bedeutung.
- Die Leistungsfähigkeit der Markerdiagnostik ist im Vergleich zu den markerunabhängigen Tests nach wie vor eingeschränkt (Sensitivität, Spezifität, Robustheit). Besondere Maßnahmen der Qualitätssicherung sollten daher unbedingt berücksichtigt werden (Chargenprüfung, interne Standards, laboreigene Validierung, Plausibilitätsprüfung).

Es wird nochmals darauf hingewiesen, dass für die Qualitätssicherung seit 2001 „deutsche BHV-1-Referenzseren sowie Referenzmilchen“ zur Verfügung stehen. Diese Seren orientieren sich an europäischen BHV-1-Standards und sollen als Referenz für eigene Kontrollproben verwendet werden. Die BHV-1-Referenzseren können über das NRL für BHV-1 bezogen werden:

- Referenzserum **R1**: deutsches BHV-1-Standardserum „positiv“; sollte von allen Testsystemen (markerunabhängige Diagnostik und Markerdiagnostik) erkannt werden

- Referenzserum **R2**: deutsches BHV-1-Standardserum „schwach positiv“; sollte von allen gB-*Blocking*-ELISAs, indirekten ELISAs sowie mit dem Neutralisationstest detektiert werden
- Referenzserum **R3**: deutsches BHV-1-Standardserum „sehr schwach positiv“; sollte von gB-*Blocking*-ELISAs detektiert werden
- Referenzseren **R31** und **R32**: BHV-1-negative Standardseren
- Referenzmilchproben **R26, R27, R28, R29**: positive und schwach positive Milchproben; Testsysteme für Sammelmilchproben sollten die Referenzmilchproben auch bei einer Verdünnung von 1:50 korrekt bewerten.
- Referenzmilchprobe **R30**: Negativmilch

Bei Bedarf können zudem spezielle Standardseren für die Überprüfung des BHV-1-NT (etwa zehn Seren) und für die Chargenvalidierung (etwa 20 Seren) beim NRL für BHV-1 angefordert werden.

Institut für Infektionsmedizin:

Retroviren der Wiederkäuer: Tierseuchenerreger, Onkogene und Immunsuppressoren

Teifke, J.P.¹, Beier, D.² und Vahlenkamp, T.W.³

¹Institut für Infektionsmedizin; ²Institut für Epidemiologie; ³Institut für Molekularbiologie

I Einleitung

Retroviren sind RNA-Viren, die meist immunsupprimierende oder tumorerzeugende, d.h. onkogene Eigenschaften besitzen. Vor rund 100 Jahren erstmals bei Hühnern als Ursache von Leukose oder Fibrosarkomen identifiziert, sind Retroviren heute bei zahlreichen Säugetieren einschließlich Primaten, Vögeln, Reptilien und Insekten bekannt. Die zur Familie *Retroviridae* gehörende Subfamilie *Orthoretrovirinae* wird aktuell in sechs Genera klassifiziert (Tabelle 1).

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 insbesondere das **Caprine Arthritis Enzephalitis Virus (CAEV)** bei Ziegen und das **Maedi Visna Virus (MVV)** bei Schafen bedeutsam. Maedi und Visna sind in der Bundesrepublik Deutschland meldepflichtig.

Über eine pathogenetische Bedeutung der *Spumaviren* ist nichts bekannt.

II Delta-Retroviren

Die Enzootische Rinderleukose (ERL) ist eine durch das BLV verursachte, in Deutschland anzeigepflichtige Tierseuche des Rindes. Im Unterschied zu der sporadisch vorkommenden und ebenfalls durch Retroviren verursachten „Adulten T-Zell-Leukämie/Lymphoma“ (ATLL) des Menschen proliferieren bei ERL die B-Lymphozyten. ERL kann mit einer persistierenden Lymphozytose (PL) und mit B-Zelltumoren einhergehen (Wittmann, 1993). Die Prävalenz der ERL ist zwar heute in vielen Ländern Mitteleuropas durch erfolgreiche Sanierungsprogramme drastisch zurückgegangen, ERL ist aber immer noch weltweit verbreitet und vor allem in den östlichen Ostseeanliegerstaaten, in Asien, Australien und in den USA sowie zuletzt in Syrien, Ägypten und ebenfalls in Südamerika (Brasilien, Argentinien) von großer wirtschaftlicher Bedeutung (Schwartz und Levy, 1994; Kurdi et al., 1999; Zaghawa et al., 2002; Gregory et al., 2004; Monti et al., 2005). In diesen Ländern kann der Anteil infizierter Tiere bis zu 60% der Herden betragen. Trotz der Weiterentwicklung und qualitativen Verbesserung der diagnostischen Systeme zum Antikörpernachweis aus dem Blutserum oder der Milch und eines seit Jahren fest etablierten Diagnostikmanagements an den Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer ist die Eradikation des BLV in der Bundesrepublik Deutschland bis heute nicht realisiert worden. Im Jahr 2000 wurden offiziell 53 Neu-

Orthoretrovirinae	
<i>Alpha-Retrovirus</i>	Aviäres Leukosevirus (ALV) Aviäres Myeloblastomvirus (AMV) Rous Sarkom Virus (RSV)
<i>Beta-Retrovirus</i>	Maus Mammary Tumor Virus (MMTV) Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV) Jaagsiekte-Retrovirus (JSRV) Enzootisches Nasentumor Virus (ENTV-1, ENTV-2)
<i>Gamma-Retrovirus</i>	Murines Leukämievirus (MuLV) Felines Leukämievirus (FeLV)
<i>Delta-Retrovirus</i>	Humanes T-Zell lymphotropes Virus (HTLV-1, HTLV-2) Bovines Leukosevirus (BLV)
<i>Epsilon-Retrovirus</i>	Walleye dermal sarcoma virus (WDSV) Snakehead Retrovirus (SnRV)
<i>Lentivirus</i>	Humanes Immunschwächevirus (HIV-1, HIV-2) Immunschwächevirus der Primaten (SIV) Felines Immunschwächevirus (FIV) Bovines Immunschwächevirus (BIV) Jembrana Disease Virus (JDV) Equines infektiöse Anämie Virus (EIAV) Caprines Arthritis Enzephalitis Virus (CAEV) Maedi Visna Virus (MVV)
Spumavirinae	
<i>Spumavirus</i>	Humanes Foamy Virus (HFV) Equines Foamy Virus (EFV) Felines Foamy Virus (FFV) Bovines Foamy Virus (BFV)

Tab. 1: Einteilung der Familie der *Retroviridae* (Subfamilie, Genus)
Quelle: International Committee on Taxonomy of Viruses
(ICTV; www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_retro.htm)

infektionen, im Jahre 2004 noch dreizehn Neuausbrüche dieser Tierseuche angezeigt. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass die Dunkelziffer ein Vielfaches beträgt.

A Bovines Leukosevirus (BLV)

Isolate des BLV aus geographisch unterschiedlichen Regionen zeigen nur eine geringe genetische Variabilität. Die genetische Information des Virus ist im Genom in die Abschnitte 5'-LTR-*gag-prt-pol-env-pX_{BL}*-3'-LTR gegliedert. Das *gag*-Gen kodiert für die nicht-glykosylierten Strukturproteine von Matrix, Kapsid und Nukleokapsid. Eine Protease wird durch das *prt*-Gen kodiert. Die Enzyme reverse Transkriptase und die Integrase werden durch das *pol*-Gen und die Hüllproteine durch das *env*-Gen kodiert (Burny et al., 1988). Zwischen dem *env*-Gen und der 3'-LTR befindet sich eine nicht-kodierende Region (NCR) und das *pX_{BL}*-Gen, dessen Genprodukte unter anderem die mRNA-Prozessierung und die effiziente Replikation des BLV-Genoms regulieren (Kettman et al., 1994).

1. Pathogenese und klinischer Verlauf

Im Verlauf der BLV-Infektion können drei Phasen diagnostiziert werden (Kettmann et al., 1994). Nach der Infektion kann während der **inapparenten Phase** provirale DNA bei zwei Dritteln der infizierten Rinder in B-Lymphozyten an unterschiedlichen Integrationsorten im zellulären Genom nachgewiesen werden (persistente Infektion). Es kommt zur Serokonversion, klinische Symptome und hämatologische Veränderungen fehlen (Mammerickx et al., 1985), oder aber es ist eine B-Lymphopenie festzustellen (Beyer et al., 2002). In dieser Krankheitsphase gelingt es, hauptsächlich gegen das Hüllprotein gp51 des BLV gerichtete Antikörper durch ELISA und Agargel-Immundiffusionstest (AGIDT) nachzuweisen. Diese diagnostischen Verfahren bilden international die Grundlage der Eradikationsverfahren. Bis zu 30% der BLV-infizierten Rinder können hämatologische Veränderungen entwickeln, die sich in einer **persistierenden Lymphozytose (PL)** mit Erhöhung der Leukozytenwerte ($>100.000/\mu\text{l}$) und polyklonaler Vermehrung der B-Lymphozyten im Blut manifestieren (Burny et al., 1988). Diese B-Lymphozyten tragen das Oberflächen-Immunglobulin M (sIgM) und exprimieren CD5 (Esteban et al., 1985; Matheise et al., 1992). Nur ein Teil dieser Zellen trägt auch provirale DNA und ist demzufolge infiziert. Auf Grund der Morphologie der expandierenden Zellpopulation und ihres biologischen Verhaltens ist die PL als benignes, nicht-neoplastisches Stadium im Krankheitsablauf anzusehen (Abbildung 1).

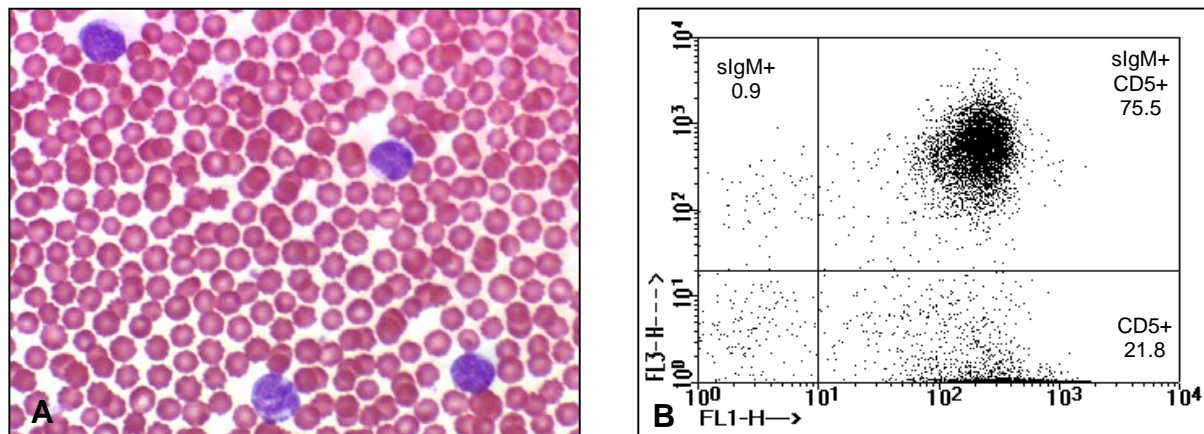


Abb. 1: Persistierende Lymphozytose nach experimenteller BLV-Infektion.

(A) Hämatologische Färbung eines Blutausstriches. Zahlreiche ausdifferenzierte B-Lymphozyten im Differenzialblutbild eines Rindes mit PL, Pappenheim. (B) Nachweis der expandierenden Population sIgM+ und CD5+ B-Lymphozyten unter den PBMC mittels FACS bei einem Rind mit PL.

Die Immunpathogenese und Entwicklung der PL ist bis heute nicht verstanden. Schließlich kann bei wiederum einem Drittel der Rinder mit PL und bei 10% ohne PL – ebenso wie bei Schafen – in der **Tumorphase** das neoplastische Stadium auftreten, welches durch lymphatisch-leukotische B-Zelltumoren in verschiedenen Organen gekennzeichnet ist (Esteban et al., 1985). Alle diese Tiere sind BLV-Träger und besitzen BLV-spezifische Antikörper, die insbesondere gegen das Coreprotein p24 gerichtet sind. Die Tumorzellen exprimieren meist CD5 und die Integrine CD11b und CD11c und erweisen sich demnach in Analogie zu den bei Mäusen charakterisierten B-Lymphozyten Subpopulationen als B-1a-Zellen (Wu et al., 1996). Tiere im Tumorstadium sterben ausnahmslos innerhalb kürzester Zeit, häufig unter leukämischem

Blutbild und Proliferation neoplastischer Lymphozyten in Lymphknoten (Ursache von Exophthalmus), Milz (Spontanruptur) und Knochenmark sowie zahlreichen anderen Organen, wie Herz, Leber, Labmagen, Uterus, Skelettmuskulatur und Rückenmark (Abbildung 2).

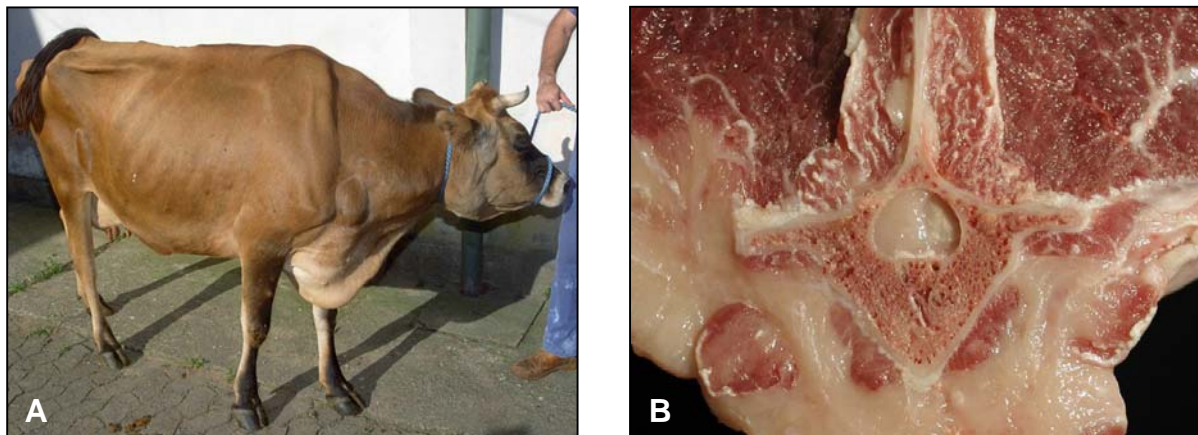


Abb. 2: Tumorstadium bei ERL eines Rindes und nach experimenteller BLV-Infektion eines Schafes.

(A) Umfangsvermehrung der Kopf-, Bug- und Kniefaltenlymphknoten durch neoplastische Wucherung bei lymphatischer Leukose (Foto: D. Driemeier) **(B)** Im Bereich der Brustwirbelsäule in die Skelettmuskulatur infiltrierendes sowie in den Wirbelkanal einwachsendes und das Rückenmark komprimierendes Tumorgewebe bei lymphatischer Leukose beim Schaf.

Als Zielzellen des BLV sind in erster Linie sIgM und CD5 koexprimierende B-Lymphozyten anzusehen, die offensichtlich das Hauptreservoir und die Infektionsquelle darstellen (Levy et al., 1987). T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen sowie Endothelzellen werden ebenfalls von BLV infiziert (Williams et al., 1988; Reinacher et al., 1989; Heeney et al., 1992; Werling et al., 1998). Aufgrund der nur kurzen Virämie von zehn bis zwölf Tagen p.i. ist es in der Regel nicht möglich, BLV nach dieser Phase aus dem Blut von Tieren im Stadium der PL oder aus den Tumoren selbst zu isolieren. In frisch aus dem Blut gewonnenen Lymphozyten (PBL) ist praktisch keine Transkription viraler RNA oder Expression viraler Proteine nachweisbar im Unterschied zu proviraler DNA (Driscoll und Olson, 1977; Cockerell und Rovnak, 1988; Lagarias und Radke, 1989). Offenbar ist Interleukin (IL)-10 während der PL wesentlich an der Hemmung der Genexpression von BLV tax-, pol- und p24 beteiligt und antagonisiert damit die durch IL-2 stimulierte Transkription dieser Gene (Pyeon et al., 1996). *In vitro* kann die Genexpression in BLV-infizierten PBMC nach LPS-Gabe gesteigert werden. Offenbar werden über einen Toll-like Rezeptor 4-vermittelten Signalweg auch die Expression von NF- κ B und IL-8 erhöht sowie reaktive Sauerstoffradikale (ROS) vermehrt gebildet (Bondzio et al., 2004).

2. Diagnostik

Die Diagnostik der ERL erfolgt pathologisch-anatomisch durch den Nachweis des Tumorstadiums. Der geäußerte Leukoseverdacht muss jedoch durch immunhistologische Tumordifferenzierung bei gleichzeitigem Nachweis der proviralen DNA sowie im Herkunftsbestand abgesichert werden. Differentialdiagnostisch spricht der Nachweis von CD3 als Marker neoplastischer T-Lymphozyten mit großer Wahrscheinlichkeit für die spontane, nicht BLV-assoziierte „Jungtierleukose“. Ein B-Zelltumor ist jedoch in hohem Maße als Hinweis für ERL anzusehen (Abbildung 3).

Auf der Grundlage der Rinder-Leukose-Verordnung und der Zuständigkeitsregelungen der Bundesländer erfolgt durch staatliche Untersuchungseinrichtungen die Antikörperdiagnostik im Blutserum oder in der Milch im ELISA mittels zugelassener Testsysteme und/oder bei Serumuntersuchungen bzw. Untersuchung des Erstkolostrums im Agargel-Immunodiffusionstest (AGIDT). Trotz einer ständigen Abnahme der Prävalenz von BLV-Infektionen verbleibt in einigen Rinderbeständen eine unbekannte Anzahl von BLV-Reagenten, die infolge fehlender, schwankender, permanent niedriger oder transientser BLV-Anti-

körper-Titer mit herkömmlichen serologischen Testmethoden nicht oder nur zu bestimmten Zeitpunkten identifiziert werden können.

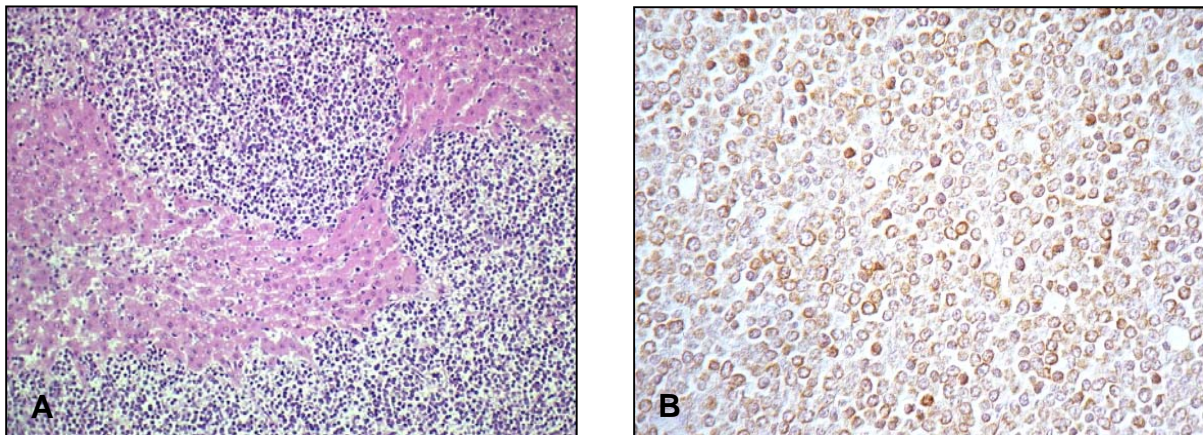


Abb. 3: Lymphatische Leukose, Leber, Jungrind.

(A) Lymphatisch leukotische Tumorzellen infiltrieren das Lebergewebe und führen zur Druckatrophie der Hepatozytenbälkchen; HE, 100x (B) Der Nachweis des T-Lymphozytenmarkers CD3 auf nahezu allen Tumorzellen spricht in sehr hohem Maße gegen das Vorliegen der Enzootischen Rinderleukose; Immunhistologie, ABC-Methode, 250x.

Als eine Alternative und Ergänzung zur BLV-Serologie werden seit mehreren Jahren am FLI molekularbiologische Methoden zum direkten BLV-Provirus-Nachweis mittels PCR entwickelt (Abbildung 4), die auch im Rahmen der Funktion als nationales und OIE-Referenzlabor validiert wurden (Beier et al., 2004, 2005). Zur Weiterentwicklung dieser Methode als *real-time* PCR werden zurzeit verschiedene Primer-Sonden Kombinationen getestet. Nur in ausgewählten Fällen kann die Diagnose auch durch elektronenmikroskopischen Erregernachweis nach Kultivierung der Lymphozyten *in vitro* gestellt werden.

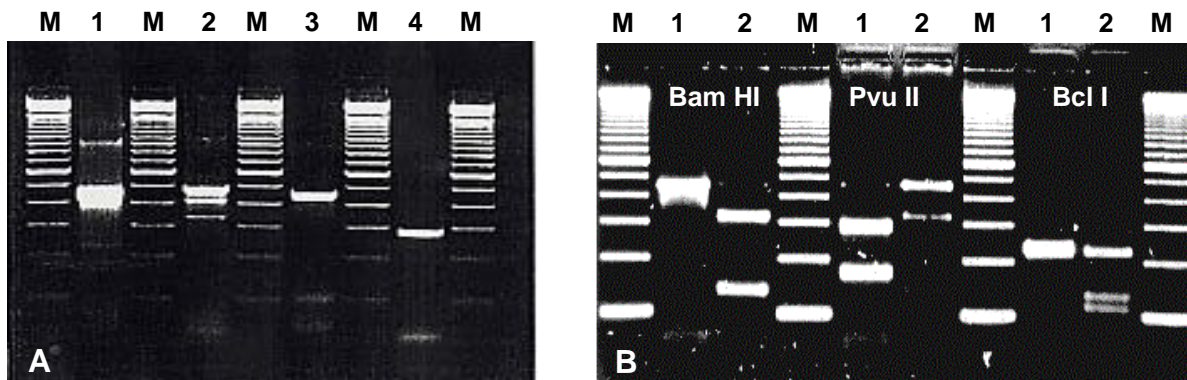


Abb. 4: Nested-PCR zum Nachweis unterschiedlicher Fragmente der BLV proviralen DNA aus PBMC.

(A) M = 100 bp Molekulargewichtsmarker; PCR-Produkte unter Verwendung von Primern aus den Genomabschnitten: 1 = *ltr* (455 bp); 2 = *prt/pol* (470 bp); 3 = *env* (444 bp); 4 = *px* (276 bp) (B) Restriction fragment length polymorphism analysis (RFLPA): Schnittprodukte der Amplifikate aus der *env*-nested-PCR zur Bestimmung der BLV-Provirus-Subtypen nach Restriktionsenzymverdau (Bam HI, Pvu II, Bcl I). M = 100 bp Molekulargewichtsmarker; 1 = PO714 (Belgischer BLV-Subtyp); 2 = Van der Maaten Zell-Linie (Japanischer BLV-Subtyp).

III Beta-Retroviren

Enzootisch auftretende, von der Ethmoidalschleimhaut ausgehende Neoplasien sind bei Schafen und Ziegen seit langem bekannt und weltweit verbreitet. Histopathologisch handelt es sich um vom Drüsenepithel der respiratorischen oder olfaktorischen Nasenschleimhaut ausgehende Adenokarzinome, die häufig lokal invasiv wachsen, seltener jedoch metastasieren und auch unter der Bezeichnung 'enzootische Nasentumoren' (ENT) zusammengefasst werden. Als Ursache dieser experimentell übertragbaren Tumoren wird beim Schaf eine Infektion mit dem Enzootischen Nasentumor Virus (ENTV-1) angesehen, einem mit dem Jaagsiekte-Retrovirus (JSRV) eng verwandten Beta-Retrovirus (De las Heras et al., 2003).

A Enzootisches Nasentumor Virus (ENTV)

Hinsichtlich der viralen Onkogenese ist bekannt, dass das Oberflächenprotein (*env*) von JSRV Zellen auf zwei möglichen Wegen transformieren kann. In kultivierten Fibroblasten kommt es durch *env* zur Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3)/Akt, während in epithelialen BEAS-2B Zellen durch *env* die Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase RON stimuliert wird. Zur Testung der Hypothese, dass auch für die Tumorentstehung die Phosphorylierung von Akt bedeutsam ist, wurde von fünf adulten Merinokreuzungsschafen, die an ENT erkrankt waren, Tumorgewebe gewonnen und histopathologisch sowie molekular untersucht. Bei der Sektion aller Tiere fanden sich von der Siebbeingegend ausgehende weiche, graurötliche, blumenkohllartige Neoplasien, die die Nasenmuscheln verdrängten (Abbildung 5). Die histopathologische Untersuchung ergab in unterschiedlichen Verteilungsmustern solide, tubuläre oder papilläre Adenokarzinome mit stellenweise eingestreuten Lymphozyten und Plasmazellen. Bei ultrastruktureller Untersuchung der Tumoren fanden sich extrazellulär, zwischen den Mikrovilli gelegen, zahlreiche runde, 90 bis 100 nm große Partikel retroviraler Morphologie. Mittels einer für das *gag*-Gen spezifischen PCR in Verbindung mit Restriktionsendonukleasespaltung und DNA-Sequenzierung wurden in allen fünf ENT spezifische ENTV-1 kodierende Sequenzen nachgewiesen. Im Weiteren wurden Ribosonden synthetisiert und an Paraffinschnitten für die *In-situ*-Hybridisierung angewendet. Genomische RNA und mRNA von ENTV-1 waren mit der antisense T7-*gag*-Sonde multifokal im Tumorgewebe im Zytoplasma sowie interzellulär nachweisbar. Korrelierend zu diesen Befunden fanden sich in den Bereichen stärkster Hybridisierungssignale zahlreiche proliferierende Tumorzellen. Der immunhistologische Nachweis von phosphoryliertem Akt in diesen Zonen gesteigerter Proliferation spricht für eine durch ENTV vermittelte Stimulation des PI3K/Akt-Signalweges. Die Spezifität des Antikörpers, der für den immunhistochemischen Nachweis von phosphoryliertem Akt verwendet wurde, konnte im Western Blot mit *in vitro* stimulierten Schafzell-Linien bestätigt werden.

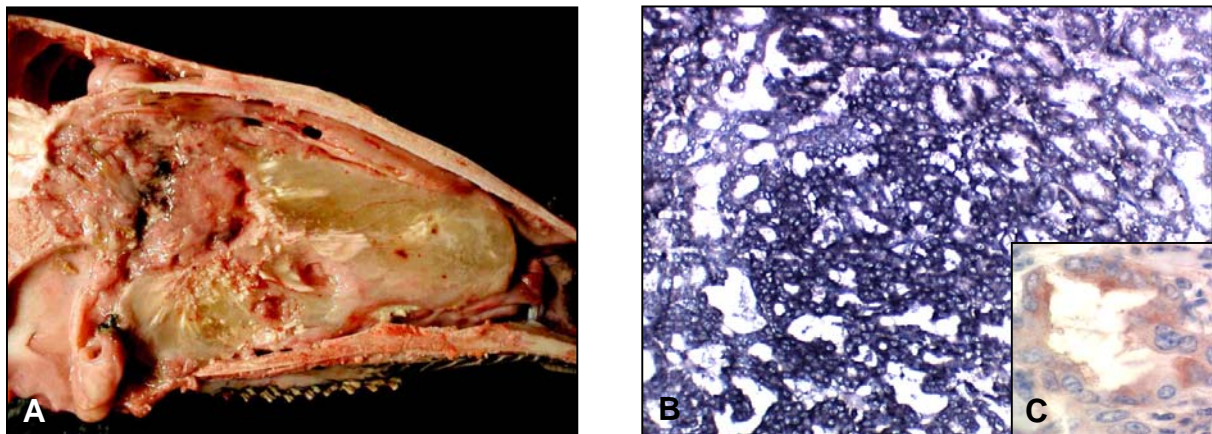


Abb. 5: Enzootischer Nasentumor, Spontaninfektion, Schaf.

(A) Der von der Ethmoidalschleimhaut ausgehende, teilweise nekrotische Tumor verdrängt und ersetzt Siebbein und Nasenmuscheln. (B) In den tubulär angeordneten Karzinomzellen findet sich nesterartig gehäuft mRNA und genomische RNA von ENTV-1; In-situ-Hybridisierung, Ribosonde gegen das *gag*-Gen, NBT-X-Phosphat, 100x. (C) Im Zytoplasma der am stärksten proliferierenden Karzinomzellen kann phosphoryliertes Akt als rotes Farbsignal nachgewiesen werden; Immunhistologie, ABC-Methode, 300x.

IV Lentiviren

Lentiviren besitzen eine komplexe Genomstruktur mit mehreren regulierenden Genen, deren Proteine die virale Genexpression modulieren (St.-Louis et al., 2004). Charakteristisch für alle Infektionen ist ein chronischer, langsam-progressiver Krankheitsverlauf, der meist mit einer Immunschwäche einhergeht. Die sich entwickelnden chronischen Krankheitssymptome werden durch bakterielle Sekundärinfektionen hervorgerufen. Diese werden im Verlauf der Infektion zunehmend therapieresistent.

A Bovines Immunschwächevirus

Das Bovine Immunschwächevirus (BIV) wurde erstmalig 1969 an der Louisiana State University bei einer Kuh (R-29) mit „Wasting-Syndrom“ beschrieben (Van Der Maaten et al., 1972). Das Virus verursachte Synzytien in der Zellkultur und zeigte große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Maedi Visna Virus (Gonda, et al., 1987). Bei serologischen Untersuchungen wurden in Europa bei klinisch unauffälligen Herden Prävalenzen zwischen 1,5 und 7% ermittelt (McNab et al., 1994). Auch aus anderen Ländern wurden ähnliche Ergebnisse berichtet. In Deutschland wurde in den Jahren 1989-1991 bei einer Erhebung eine Antikörper-Prävalenz von 6,6% gefunden (Muluneh, 1994).

Ein Zusammenhang der Infektion mit klinisch manifester Erkrankung ist bisher nicht eindeutig beschrieben, auch wenn nach experimenteller Infektion von Kälbern eine Lymphozytose und Proliferation von lymphatischem Gewebe beobachtet wurde (Van Der Maaten et al., 1972). Die experimentellen Infektionen erstreckten sich über einen Zeitraum von 2 bis 2,5 Jahre und erlaubten keine Aussagen über eine einhergehende Immunschwäche. Auch längerfristige, sich über mehr als vier Jahre erstreckende Infektionsversuche erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse in dieser Hinsicht (Snider et al., 1997). Geringere Milchleistungen, über die gelegentlich berichtet wird, sind ein wenig spezifischer Befund, der mit zahlreichen anderen Ursachen in Verbindung stehen kann. Eine staatliche Bekämpfung erfolgt zur Zeit nicht.

B Jembrana Disease Virus

„Jembrana disease“ ist eine Lentivirusinfektion, die in der akuten Infektionsphase schwere klinische Symptome (Fieber, Lethargie, Anorexie, Lymphadenopathie) verursachen kann. Diese Erkrankung tritt insbesondere im Nordwesten Balis, Distrikt Jembrana, beim Banteng (*Bos javanicus*) mit Mortalitätsraten bis zu 20% auf. Mildere klinische Symptome werden bei anderen Rinderarten (*Bos taurus*, *Bos indicus*) und beim Büffel (*Bubalus bubalis*) beobachtet. Das die Symptome verursachende Virus wurde als Lentivirus klassifiziert und als Jembrana disease virus (JDV) bezeichnet (Chadwick et al., 1995a). Sequenzanalysen ergaben eine sehr enge Verwandtschaft mit dem BIV. Die Homologie der Aminosäuresequenz im Kapsidprotein beträgt 75% und im Transmembranprotein 31% (Chadwick et al., 1995b). Zwischen den Kapsidproteinen beider Viren besteht eine serologische Kreuzreaktivität, so dass die momentan verfügbaren serologischen Methoden beide Viren nicht differenzieren können. Die Krankheitssymptome, die durch beide Viren hervorgerufen werden, sind allerdings sehr unterschiedlich. Vergleichende molekularbiologische Untersuchungen zur Klärung der Pathogenitätsmechanismen wären deshalb von Interesse.

C Maedi Visna Virus

Die Maedi-Visna (MV) Erkrankung des Schafes und die Caprine Arthritis und Enzephalomyelitis (CAE) zählen zu den Lentivirus-Infektionen der kleinen Wiederkäuer, die sich durch lange Inkubationszeiten auszeichnen, wobei es mehrere Monate dauern kann, bis Antikörper nachweisbar sind. Obwohl Infektionen mit Maedi Visna Virus (MVV) in den meisten Fällen subklinisch verlaufen, kann es in stark infizierten Beständen durch das Auftreten von Mastitiden, chronischen Erkrankungen des Respirationstraktes (Ovine Progressive Pneumonie, OPP), Gelenksentzündungen oder Geburt von lebensschwachen oder untergewichtigen Lämmern zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten kommen. Bei MV handelt es sich um zwei Krankheitsbilder, die durch das gleiche Virus verursacht werden und regelmäßig zum Tode führen. Nach mehrjähriger Inkubationszeit (meist erkranken Schafe erst nach dem 2. Lebensjahr) magern die Tiere bei **Maedi** stark ab, entwickeln schwere Atemnot (interstitielle Pneumonie mit hyperplastischen Lymphfollikeln) und Leukozytose mit lymphozytärem Blutbild. **Visna** ist durch langsamen, häufig atypischen Krankheitsverlauf mit Ataxie, Hinterhandparese und anderen motorischen Ausfällen auf Grund einer progressiven demyelinisierenden Leukoenzephalitis gekennzeichnet. Auch bei Visna kommt es schließlich zur Kachexie. Eine der wichtigsten Übertragungsformen ist die galaktogene Infektion bei den Lämmern sowie alle Möglichkeiten, bei denen Leukozyten von Tier zu Tier übertragen werden können.

D Caprines Arthritis-Enzephalomyelitis Virus

Die CAE der Ziegen wird durch eine Virusinfektion verursacht, die sich, je nach Alter der betroffenen Tiere, in Leukoenzephalomyelitis (Lokomotionsstörungen der zwei bis vier Monate alten Lämmer) oder Polyarthritits, interstitieller Pneumonie mit alveolärer Proteinexsudation und Pneumozyten Typ II Hyperplasie sowie Mastitis (Adulte) äußert. Das diese Symptome verursachende Caprine Arthritis-Enzephalitis Virus (CAEV) wurde 1980 erstmals isoliert (Crawford et al., 1980). Die Gelenksveränderungen beginnen häufig mit der Verdickung und Anfüllung bevorzugt der *Bursa praecarpalis* und manifestieren sich später als chronische proliferative Synoviitis und Periarthritis, die schließlich zu einer ausgeprägten Lahmheit der Vordergliedmaßen führt (Abbildung 6). Die Tiere magern trotz guten Appetits ab. Es erkranken nur ca. 1/3 der serologisch positiven Tiere. Die Ansteckung der Neugeborenen erfolgt durch das Kolostrum. Die horizontale und intrauterine Übertragung ist möglich, jedoch von untergeordneter Bedeutung. Die Diagnostik von CAEV beruht auf dem Nachweis von Antikörpern im Serum mittels ELISA. In einzelnen Ländern werden serologische Untersuchungen aufgrund von freiwilligen Bekämpfungsprogrammen durchgeführt.

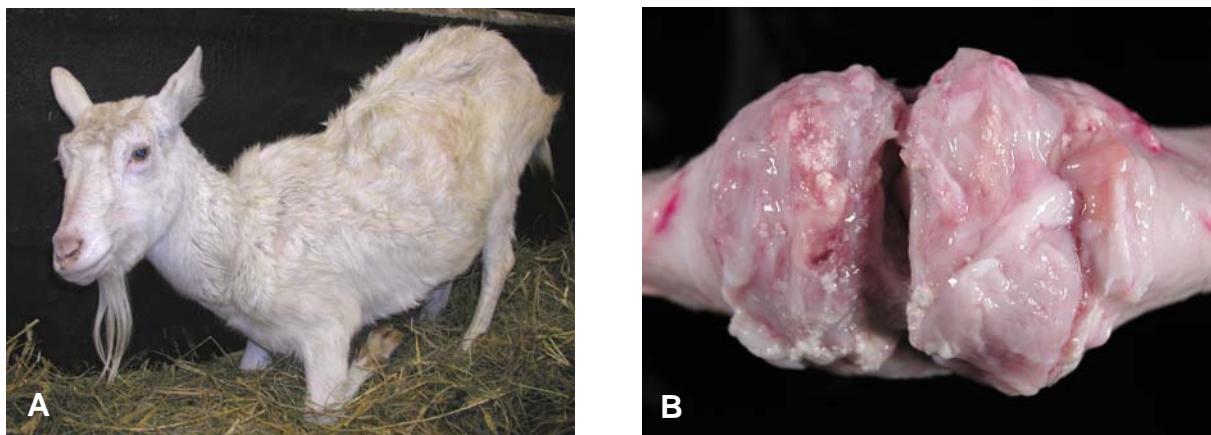


Abb. 6: Caprine Arthritis Enzephalomyelitis, Polyarthritits nach experimenteller Infektion, Weiße Deutsche Edelziege.

(A) Ausgeprägte Lahmheit mit Verharren auf den Karpalgelenken bei fortgeschrittener Abmagerung. **(B)** Hochgradige proliferative Synoviitis mit Pericarpitis und dystrophischen Mineralisationsherden.

Literatur

- Beier, D., R. Riebe, P. Blankenstein, E. Starick, A. Bondzio und O. Marquardt.** 2004. Establishment of a New Bovine Leukosis Virus (BLV) Producing Cell Line. *J. Virol. Methods* **121**:239-246.
- Beier, D., R. Lohse und A. Bothur.** 2005. Neue Wege zur effektiveren Tierseuchenbekämpfung durch Bündelung der Diagnostik am Beispiel der enzootischen Rinderleukose (ERL). *Tierärztl. Umschau* **60**:675-679.
- Beyer, J., B. Köllner, J.P. Teifke, E. Starick, D. Beier, I. Reimann, U. Grunwald und M. Ziller.** 2002. Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. *J. Vet. Med. B* **49**:270-277.
- Bondzio A.** 2004. persönliche Mitteilung.
- Burny, A., Y. Cleuter, R. Kettman, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle, A. Van Den Broeke, L. Willems und R. Thomas.** 1988. Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **32**:149-170.
- Chadwick B.J., R.J. Coelen, G.E. Wilcox, L.M. Sammels und G. Kertayadnya.** 1995a. Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with an acute disease syndrome. *J. Gen. Virol.* **76**:1637-1650.
- Chadwick B.J., R.J. Coelen, L.M. Sammels, G. Kertayadnya und G.E. Wilcox.** 1995b. Genomic sequence analysis identifies Jembrana disease virus as a new bovine lentivirus. *J. Gen. Virol.* **76**:189-192.
- Cockerell, G.L. und J. Rovnak.** 1988. The correlation between the direct and indirect detection of bovine leukemia virus infection in cattle. *Leuk. Res.* **12**:465-469.
- Crawford, T.B., D.S. Adams, W.P. Cheevers und L.C. Cork.** 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* **207**:997-999.
- De las Heras, M., A. Ortin, C. Cousens, E. Minguijon und J.M. Sharp.** 2003. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **275**:201-233.
- Driscoll, D.M. und C. Olson.** 1977. Bovine leukemia virus-associated antigens in lymphocyte cultures. *Am. J. Vet. Res.* **38**:1897-1898.
- Esteban, E.N., R.M. Thorn und J.F. Ferrer.** 1985. Characterization of the blood lymphocyte population in cattle infected with the bovine leukemia virus. *Cancer Res.* **45**:3225-3230.
- Gregory, L., P.S. Carneiro, E.H. Birgel, D. Beier, M.A. Akamatzu, R. Harakava, M. Lara, E.M. Pituco, J. Olivera, V. Ferreira und A. Ikunoa.** 2004. Nested Polymerase Chain Reaction validated for sensitive detection of bovine leukaemia virus in blood samples from Brazilian cattle herds: comparison with conventional ELISA and Agar Gel Immunodiffusion methods. *Arq. Inst. Biol.* **71**:303-308.
- Gonda, M.A., M.J. Braun, S.G. Carter, T.A. Kost, J.W. Bess, L.O. Arthur und M.J. van der Maaten.** 1987. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature* **330**:388-391.
- Heeney, J.L., P.J. Valli, R.M. Jacobs und V.E. Valli.** 1992. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Lab. Invest.* **66**:608-617.

- Kettman, R., A. Burny, I. Callebaut, L. Droogmans, M. Mammerickx, L. Willems und D. Portetelle.** 1994. Bovine Leukemia Virus. In: J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*. Plenum Press, New York, p. 39-81.
- Kurdi, A., P. Blankenstein, O. Marquardt und D. Ebner.** 1999. Serologic and virologic investigations on the presence of BLV infection in a dairy herd in Syria. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **112**:18-23.
- Lagarias, D.M. und K. Radke.** 1989. Transcriptional activation of bovine leukemia virus in blood cells from experimentally infected, asymptomatic sheep with latent infections. *J. Virol.* **63**:2099-2107.
- Levy, D., R. Kettmann, P. Marchand, S. Djilali und A.L. Parodi.** 1987. Selective tropism of bovine leukemia virus (BLV) for surface immunoglobulin-bearing ovine B lymphocytes. *Leukemia* **1**:463-465.
- Mammerickx, M., D. Portetelle und A. Burny.** 1985. The diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **8**:305-309.
- Matheise, J.P., M. Delcommenne, A. Mager, C.H. Didembourg und J.J. Letesson.** 1992. CD5+ B cells from bovine leukemia virus infected cows are activated cycling cells responsive to interleukin 2. *Leukemia* **6**:304-309.
- McNab, W.B., R.M. Jacobs und H.E. Smith.** 1994. A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and associations between test results, production records and management practices. *Can. J. Vet. Res.* **58**:36-41.
- Monti, G.E., R. Schrijver und D. Beier.** 2005. Genetic diversity and spread of Bovine Leukemia virus isolates in argentine dairy cattle. *Arch. Virol.* **150**:443-458.
- Muluneh, A.** 1994. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-virus (BIV) antibodies in the cattle population in Germany. *J. Vet. Med. B* **41**:679-684.
- Pyeon, D., K.L. O'Reilly, und G.A. Splitter.** 1996. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *J. Virol.* **70**:5706-5710.
- Reinacher, M., M.C. Thurmond, M. Onuma, D. Portetelle, J. Picanso und G.H. Theilen.** 1989. Immunohistological demonstration of virus and tumor associated antigens in tissues experimental and spontaneous bovine leukemia virus (BLV) infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **22**:223-231.
- Schwartz, I. und D. Levy.** 1994. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Res.* **25**:521-536.
- Snider, T.G., P.G. Hoyt, B.F. Jenny, K.S. Coats, D.G. Luther, R.W. Storts, J.K. Battles und M.A. Gonda.** 1997. Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **13**:151-176.
- St.-Louis, M.C., M. Cojocariu und D. Archambault.** 2004. The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses. *Anim. Health Res. Rev.* **5**:125-143.
- Van der Maaten, M.J., A.D. Boothe und C.L. Seger.** 1972. Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**:1649-1657.
- Werling, D., C.J. Howard, E. Niederer, O.C. Straub, A. Saalmuller und W. Langhans.** 1998. Analysis of the phenotype and phagocytic activity of monocytes/macrophages from cattle infected with the bovine leukaemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **62**:185-195.
- Williams, D.L., O. Barta und G.F. Amborski.** 1988. Molecular studies of T-lymphocytes from cattle infected with bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **19**:307-323.

Wittmann, W. 1993. Leukosen der Wiederkäuer. Fischer, Jena.

Wu, D., K. Takahashi, K. Murakami, K. Tani, A. Koguchi, M. Asahina, M. Goryo, Y. Aida und K. Okada. 1996. B-1a, B-1b and conventional B cell lymphoma from enzootic bovine leukosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **55**:63-72.

Zaghawa A., D. Beier, I.H. Abd El-Rahim, I. Karim, S. El-ballal, F.J. Conraths und O. Marquardt. 2002. An outbreak of enzootic bovine leukosis in upper Egypt: clinical, laboratory and molecular-epidemiological studies. *J. Vet. Med. B* **49**:123-129.

Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger:

Synthetische Prionen

Eiden, M.* und Groschup, M.H.

Prionen (“proteinaceous infectious particles”) gelten nach der „Prionen-Hypothese“ als Verursacher der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE), die beim Menschen die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, beim Rind BSE und beim Schaf Scrapie auslösen.

Dem Prion-Protein (Pr^{PC}) kommt eine zentrale Rolle bei diesen TSE-Erkrankungen zu. Dieses Protein wurde bei allen Säugetierspezies sowie bei Vögeln und Fischen nachgewiesen und ist innerhalb der Mammalier hochkonserviert. Dies spricht dafür, dass das Protein eine wichtige Funktion erfüllen sollte, obwohl ihm eine solche bisher nicht eindeutig zugewiesen werden konnte. Das unprozessierte Prion-Protein des Menschen umfasst 253 Aminosäuren und besteht aus einem langen flexiblen amino-terminalen Ende und einem carboxy-terminalen Teil, dessen Tertiärstruktur aus drei alpha-Helices und zwei beta-Faltblattstrukturen zusammengesetzt ist. Mit der Zelloberfläche ist es durch einen Glykophosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker verbunden, der im endoplasmatischen Retikulum anstelle der letzten 21 Aminosäuren angehängt wird. Am N-terminus befindet sich zunächst ein Signalpeptid zur Translokation des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum, sodass nach Abspaltung des Signalpeptids das fertig prozessierte Protein je nach Spezies nur ca. 208 Aminosäuren umfasst. Dort können ferner zwei Zuckerseitenketten auf das Molekül übertragen werden, so dass Pr^{PC} in der Zelle sowohl als nicht-glykosyliertes, mono- als auch diglykosyliertes Protein vorliegt.

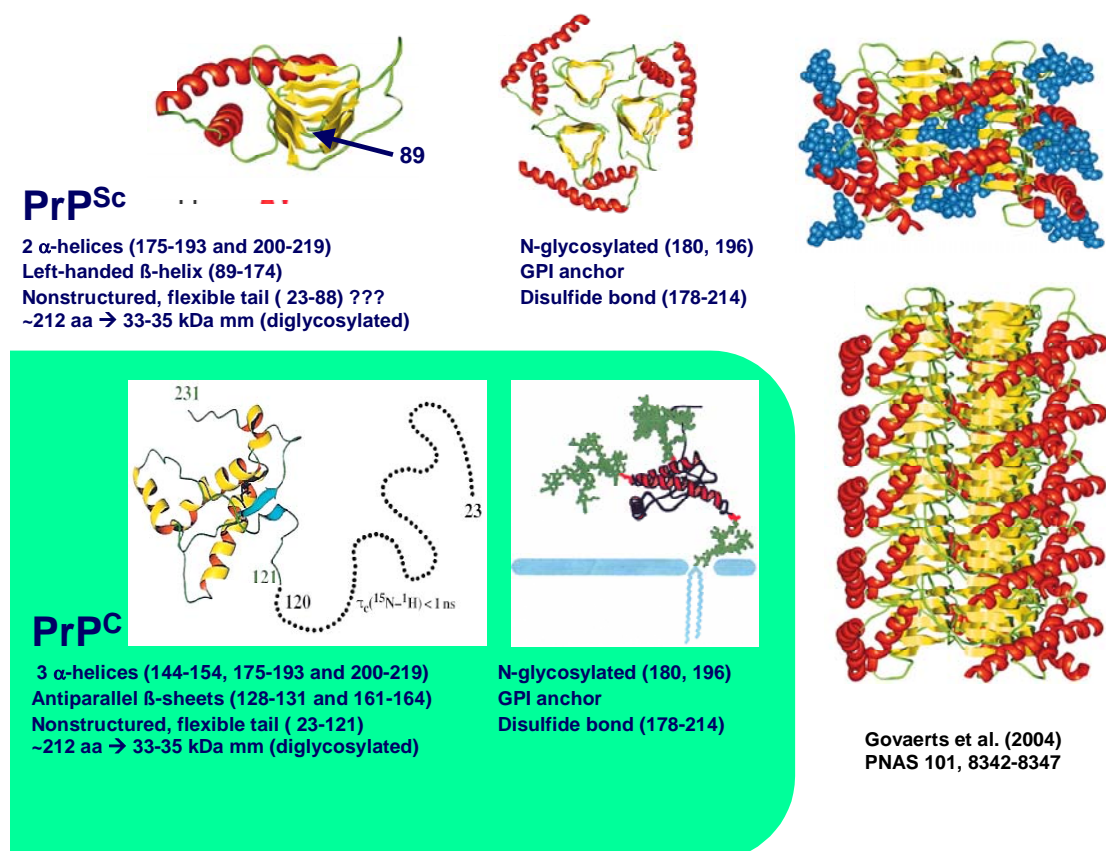


Abb. 1 Schematische Darstellung der Raumstruktur von Pr^{PC} und Pr^{PSc}

Die zelluläre Form des Pr^{PC} wird besonders auf Nervenzellen, aber auch auf der Oberfläche zahlreicher anderer Zellpopulationen, wie den Zellen des lymphatischen Systems, auf Thrombozyten oder auf Nierenzellen gefunden. Während der Pathogenese der Prion-Erkrankungen kommt es zur Umfaltung von Pr^{PC} zur pathologischen Isoform, Pr^{PSc} (Abb. 1).

Diese Isoform, die einen erhöhten Gehalt an β -Faltblatt-Strukturen (die miteinander über eine Disulfid-Brücke stabilisiert sind) aufweist, ist unlöslich in milden Detergenzien und ist teilweise resistent gegen einen Verdau durch Proteasen. Diese erhöhte proteolytische Resistenz führt zu einer Akkumulation des pathologischen Proteins in den späten Endolysosomen, die sich mittels Amyloid-Färbungen oder spezifischer Antikörper anfärben lassen. Pr^{PSc} lagert sich aber auch auf der Zelloberfläche und im interstitiellen Raum ab. Im betroffenen Gewebe gehen die Nervenzellen apoptotisch zugrunde, was wahrscheinlich nicht alleine auf die Pr^{PSc}-Ablagerungen zurückzuführen ist, da es Hinweise darauf gibt, dass diese im Gewebe per se inert sind.

Die Behandlung von Pr^{PSc} mit proteolytischen Enzymen spaltet i.d.R. lediglich die N-terminalen Aminosäuren bis zu den Positionen 81-95 (je nach Erregerstamm und Stärke des Proteasenverdau) ab, so dass das proteolytisch behandelte Pr^{PSc} nur noch die Aminosäuren 81-95 \rightarrow 231 umfasst. Anders als bei Pr^{PC} ist die räumliche Struktur des Pr^{PSc} bisher noch unbekannt. Anhand von kristallographischen Daten wurde auf der Basis von Strukturen bereits bekannter 'ähnlicher' Proteine postuliert, dass sich in Pr^{PSc} im Bereich 81-95 \rightarrow 171 β -Faltblattstrukturen ausbilden, die sich in einer linksläufigen β -Helix anordnen. Die davon carboxy-terminal lokalisierten Strukturen sollen dagegen erhalten bleiben. Je drei Pr^{PSc}-Moleküle sollen sich zu einer primären Einheit zusammenlagern und damit das Kerngerüst zur Ausbildung der so genannten Scrapie-assoziierten Fibrillen bilden.

Die Umfaltung des Pr^{PC} zu Pr^{PSc} wird auch als Konversion bezeichnet. Das pathologische Prion-Protein besitzt die besondere Eigenschaft, diese Faltung auf weitere Prion-Proteine zu übertragen und damit infektiös zu sein. Die Eigenschaften des Prion-Proteins, wie die Zunahme des β -Faltblatt-Struktur-Anteils und die Resistenz gegenüber Proteinase K, lassen sich auch *in vitro* induzieren, wobei man dabei statt von Pr^{PSc} von Pr^{Pres} spricht. Die Konversion von aus eukaryontischen Zellen aufgereinigtem, radioaktiv-markiertem Pr^{PC} in Pr^{Pres} gelang bereits Mitte der neunziger Jahre, indem es mit aus Gehirngewebe aufgereinigtem Pr^{PSc} im Überschuss und unter denaturierenden Bedingungen inkubiert wurde. Bis vor kurzem gelang diese Konversion allerdings noch nicht mit bakteriell exprimierten Pr^{PC} als Substrat und unter Verwendung equimolarer seminativer Bedingungen. Dies konnte nun am INNT mittels eines wesentlich einfacheren zellfreien Konversionstests erzielt werden. Dabei wurde in *E. coli* gebildetes murines Prion-Protein zusammen mit infektiösen, aus der Maus isolierten Pr^{PSc} für drei Tage inkubiert. Dabei lässt sich umgefaltetes Pr^{Pres} mit einem spezifischen Antikörper, der nur das neu konvertierte Pr^{Pres} nicht aber das eingesetzte Pr^{PSc} erkennt, nachweisen (Abb. 2).

Die Bestätigung, dass infektiöse Prion-Proteine *de novo* und ohne initiale Zugabe von Infektiosität erzeugt werden können, käme dem Beweis der Prion-Theorie gleich, am besten wenn diese neu generierten 'Prionen' synthetisch im Reagenzglas erzeugt werden könnten.

Eine erste Näherung war die Generierung transgener Mäuse, die eine Prion-Protein-Mutante [Austausch Proline \rightarrow Leucine an Position 102 (bzw. 101 bei der Maus)] überexprimierten, die beim Gerstmann-Sträussler-Scheincker-Syndrom vorkommt, einer weiteren familiären Prion-Erkrankung beim Menschen mit 100%iger Penetranz. So entwickelt eine Mauslinie (MoPrP P101L), die das Transgen mit dem Austausch achtfach überexprimiert, spontane neurodegenerative Defekte (Hsiao et al., 1994). Dagegen bleiben Mäuse mit einem geringeren Expressionslevel des gleichen Transgens gesund. Diese Mäuse erkrankten jedoch an einer Prion-Erkrankung, wenn sie mit einem Homogenat der überexprimierenden, erkrankten Mäuse inokuliert wurden. Der gleiche Effekt ließ sich durch die Inokulation von rekombinantem Pr^{PC} induzieren, das ebenfalls den [Pro102 \rightarrow Leu] Austausch besaß und zuvor in einem *In-vitro*-Test in eine β -Faltblatt-haltige Konformation überführt worden war. Nicht konvertiertes, vorwiegend α -helikales rekombinantes Pr^{PC} konnte die Erkrankung nicht auslösen. Dies war ein weiterer Hinweis auf eine inhärente Infektiosität des konvertierten Prion-Proteins.

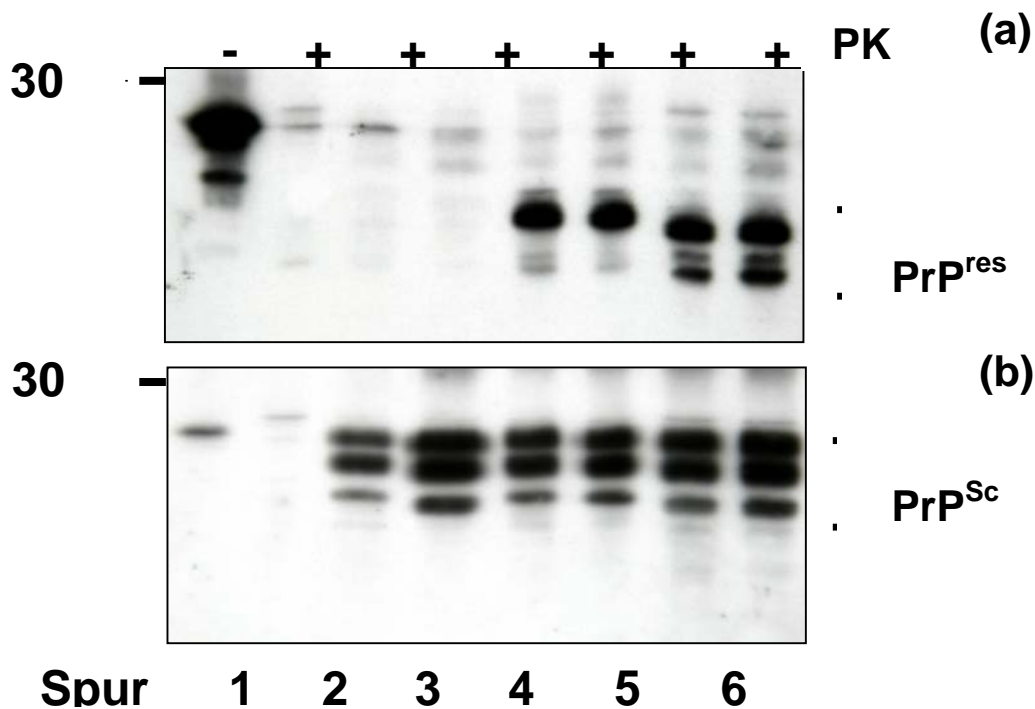


Abb. 2 Immunoblot zur Darstellung der Konversion von rekombinantem Pr^{PC} mit Pr^{PSc} der Prion-Erregerstämme Me7 und BSE (Eiden, unveröffentlicht)

- Spur 1 enthält zur Kontrolle rekombinantes Pr^{PC} ohne weitere Behandlung (d.h. ohne jedwede Pr^{PSc}-Zugabe, Inkubation und ohne darauf folgenden PK-Verdau), Spur 2 rekombinantes Pr^{PC} ohne Pr^{PSc}-Zugabe und Inkubation sowie PK-Verdau, Spuren 3 und 4 rekombinantes Pr^{PC} mit Me7- bzw. BSE-Pr^{PSc}-Zugabe ohne Inkubation sowie PK-Verdau. Die Spuren 5 und 6 (Me7) sowie 7 und 8 (BSE) zeigen jeweils PK-resistentes Pr^{PSc}, welches aus dem rekombinanten Pr^{PC} nach einer 72-stündigen Inkubation mit Pr^{PSc} gebildet wurde. Zur Anfärbung des rekombinanten Pr^{PC} und des daraus entstehenden Pr^{res} wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der das eingesetzte Ursprungs-Pr^{PSc} nicht erkennt.
- Zur Kontrolle wurde der unter a) dargestellte Immunoblot anschließend mit einem Antikörper angefärbt, der mit dem eingesetzten Ursprungs-Pr^{PSc} (Me7 oder BSE) reagiert.

Vorarbeiten zur authentischen Generierung von Prionen *in vitro* befassten sich mit der Herstellung von rekombinantem Pr^{PC}, welches bereits teilweise Eigenschaften der pathologischen Isoform besaß. Hierzu wurde humanes Pr^{PC} bakteriell exprimiert und unter spezifischen Pufferbedingungen in eine zumindest konformelle, β -Faltblatt-reiche Isoform überführt (Jackson et al. 1999). Gleiche Ergebnisse wurden mit murinem Pr^{PC} erzielt (Baskakov et al., 2002). Bei neutralem pH-Wert beginnen diese β -Oligomere zu aggregieren und Amyloid-Strukturen auszubilden. In saurem Milieu, wie es in Lysosomen und Endosomen vorherrscht, bleiben die oligomeren Strukturen erhalten.

Die Frage, ob dieses oder ähnliches in diesen Versuchen hergestellte Pr^{res} auch infektiös war, behandelten die Versuche von Legname et al. (2004). Sie verwendeten bakterielles Prion-Protein (recMoPrP[89-230]), das durch Verwendung eines geeigneten Protokolls in eine fibrilläre Struktur überführt und anschließend in Mäuse intrazerebral inokuliert wurde. Verwendet wurde für diese Experimente eine transgene Mauslinie (Tg9949), die das C-terminale Prion-Protein [89-231] überexprimiert. Nach 380-660 Tagen erkrankten Mäuse an neurodegenerativen Defekten, während mit PBS inokulierte Kontrolltiere gesund blieben. Mittels Westernblot konnte die pathologische Isoform des Prion-Proteins im Gehirn der Tiere nachgewiesen werden. Der histologische Befund zeigte ebenfalls das typische Erscheinungsbild mit starker Vakuolisierung. Die Größe und Verteilung der Vakuolen war jedoch untypisch im Vergleich zu Mäusen, die mit einem herkömmlichen Maus-Scrapie-Stamm (RML) infiziert worden waren. Das Hirnmateriale der erkrankten Tg9949-Mäuse wurde anschließend in normale Wildtypmäuse inokuliert und diese erkrankten nach 90-150 Tagen mit dem für TSE-Erkrankungen typischen Krankheitsbild.

Dies war nach Meinung der Autoren der Nachweis, dass mit *in vitro* hergestelltem Prion-Protein diese Erkrankung *de novo* ausgelöst werden konnte - eine Art Beweis dafür, dass ausschließlich ein Protein und nicht ein Virus bzw. eine (modifizierte) Nukleinsäure die Krankheit verursacht. Außerdem zeigten die Experimente, dass für die Infektiosität weder die Glykosylierung des Prion-Proteins noch der GPI-Anker erforderlich sind.

Der experimentelle Aufbau wurde jedoch auch kritisiert, da für die Erstinfektion eine transgene Mauslinie verwendet wurde, die ein artifizielles Prionkonstrukt überexprimiert, was dazu führt, dass diese Mäuse im fortgeschrittenen Alter (> 500 Tage) spontan an einer ebenfalls neurodegenerativen Erkrankung zugrunde gehen. Ein geeigneter Beweis für die Prion-Hypothese wäre deshalb die Erstübertragung synthetischer Prionen auf normale Wildtypmäuse (News Focus, 2005).

Die Überexpression des PrP^C führt jedoch nicht automatisch zu einer neurodegenerativen Erkrankung. So wurden am INNT verschiedene transgene Mauslinien generiert, die statt der murinen das bovine (Tg^{bov}) oder ovine (Tg^{shp}) PrP^C um das 8-16fache überexprimieren, ohne offensichtliche unphysiologische Effekte bei den Tieren zu verursachen (Buschmann et al., 2000). Dagegen traten bei Tg^{mubo}-Mäuse, die ein chimäres PrP^C mit Aminosäuresequenzen aus der Maus und dem Rind ausbilden, neurologische Symptome auf (Lähmungen an der Hinterhand, zentralnervöse Störungen bis zum krankheitsbedingten Tod der Tiere im fortgeschrittenen Alter), die durchaus an Scrapie erinnern. Allerdings konnte bei diesen Mäusen im Rahmen von umfangreichen Übertragungsversuchen auf konventionelle und transgene (mit Überexpression des bovinen, murinen oder chimären PrP^C) Mäuse keinerlei spontan *de novo* gebildete Infektiosität nachgewiesen werden.

Eine anderer Ansatz, um synthetisches Prion-Protein zu generieren, wurde von einer Arbeitsgruppe um Claudio Soto an der Universität Texas/USA etabliert (Saborio et al., 2001). Die Gruppe entwickelte eine neuartige Methode, mit der PrP^{Sc} *in vitro* amplifiziert werden kann und die als PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) bezeichnet wird (Abb. 3). Dazu wird Scrapie-infiziertes Hamsterhirn homogenisiert und zusammen mit dem Hirnhomogenat gesunder Hamster inkubiert. Der Ansatz wird mit Ultraschall behandelt, wodurch die PrP^{Sc}-Fibrillen aufgelöst werden und als Matrize für die Anlagerung und Umfaltung des zellulären PrP^C dienen. Der Ansatz wird anschließend mit Hirnhomogenat gesunder Hamster verdünnt und wieder beschallt, so dass nach mehrmaliger Wiederholung dieser Prozedur das ursprünglich eingesetzte PrP^{Sc} verdünnt und neu gebildetes PrP^{Sc} angereichert wird.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung (Castilla et al., 2005a) wurde gezeigt, dass Homogenate nach mehreren hundert PMCA-Zyklen und einer Verdünnung von 10⁻²⁰ noch immer infektiös waren. Bei einer Verdünnung von 10⁻²⁰ befindet sich rein rechnerisch kein einziges Molekül des ursprünglichen infektiösen PrP^{Sc} mehr im Ansatz, sondern ausschließlich *de novo* mittels PMCA generiertes PrP^{Pres}. Hamster, die mit diesem Material inokuliert wurden, erkrankten an Scrapie. Dies zeigt, dass *in vitro* amplifiziertes PrP^{Pres} infektiös sein kann. In einer weiteren Publikation (Castilla et al., 2005b) konnte mit dieser Methode PrP^{Sc} im Blut Scrapie-erkrankter Hamster nachgewiesen werden. Dies war die erste Studie überhaupt, in der es gelang, in Blut PrP^{Sc} nachzuweisen. Dabei lag die Sensitivität bei 89% und die Spezifität bei 100%.

Die bisher veröffentlichten Untersuchungen wurden bisher nur mit aus dem Hamster stammenden PrP^C und PrP^{Sc} durchgeführt. Dieses Amplifikationsprinzip soll jedoch prinzipiell auch mit PrP^{Sc} und PrP^C anderer Spezies und mit anderen Erregerstämmen funktionieren. Es würde sich damit vielleicht die Möglichkeit eröffnen, aufgrund der wesentlich höheren analytischen Sensitivität des Verfahrens BSE-Infektionen beim Rind und Scrapie-Infektionen beim Schaf mittels eines Lebendtests zu diagnostizieren. In einer Zusammenarbeit mit der texanischen Arbeitsgruppe soll dieses Nachweisverfahren deshalb im Jahre 2006 am INNT etabliert werden.

Somit gibt es deutliche Hinweise, aber noch keine abschließenden Beweise dafür, dass Prionen synthetisch hergestellt werden können. Wie immer in der Wissenschaft gilt es nun, die als Durchbruch gefeierten Ergebnisse in anderen Arbeitsgruppen zu reproduzieren und damit zu verifizieren. Trotz dieser prinzipiellen Erfolge gibt es noch keine Erklärung für die molekulare Grundlage der unterschiedlichen Prion-Erregerstämme. Prion-Erregerstämme lassen sich durch ihre Übertragungscharakteristika und durch die biochemischen Eigenschaften des jeweiligen PrP^{Sc} (Unterschiede in der PK-Schnittstelle (s.o.), der generellen PK-Resistenz, der Glykosylierung u.a.) voneinander unterscheiden, die sich bisher nicht mit der Vorgabe des Prion-Proteins mit definierter Aminosäurespezies erklären lassen. Deshalb wird auch die Suche nach bisher unbekanntem Kofaktoren (Proteine, Nukleinsäuren etc.), die diese Charakteristika moderieren könnten, weitergehen.

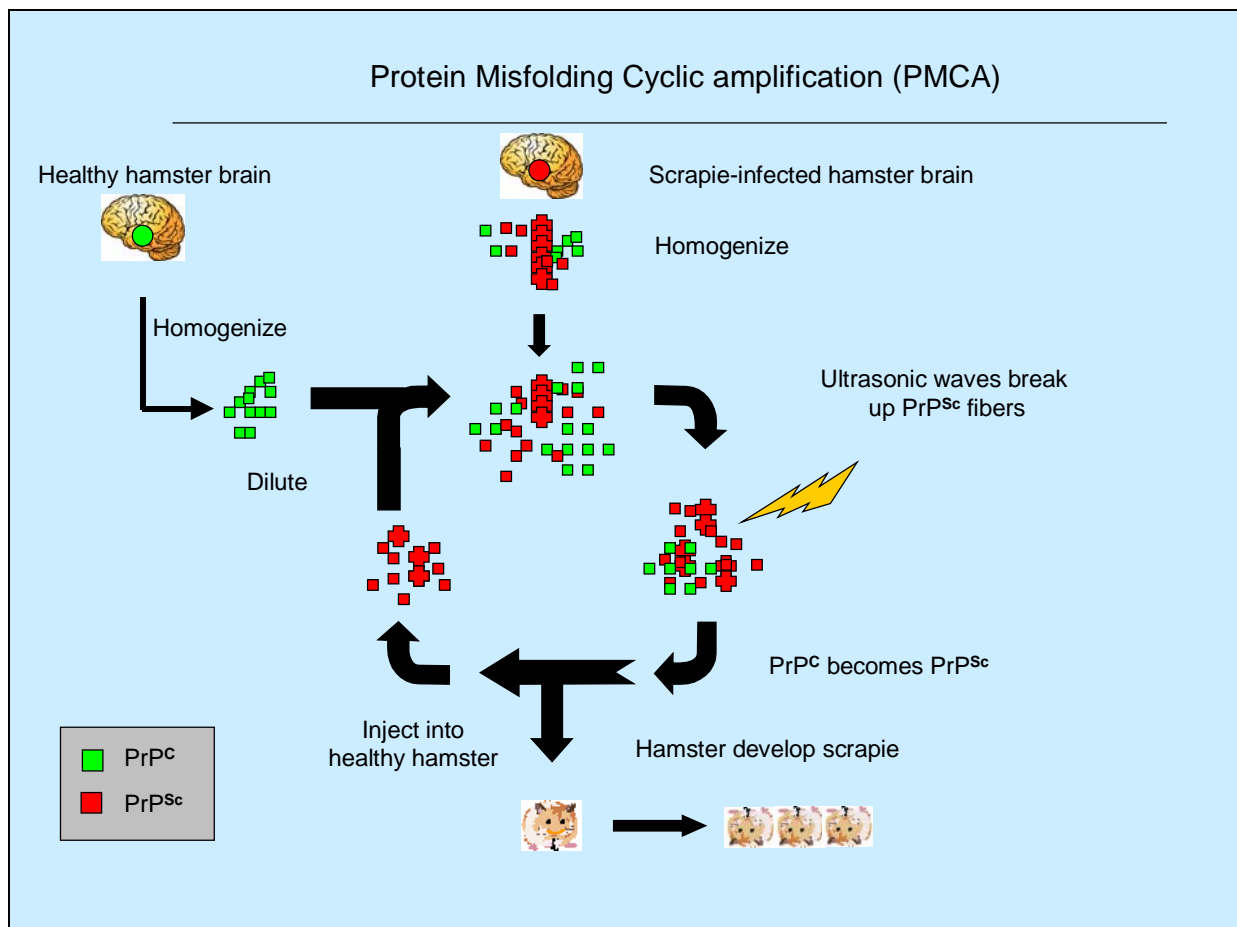


Abb. 3: Vermehrung infektiösen Prion-Proteins durch PMCA: Hirnhomogenat gesunder und an Scrapie erkrankter Hamster werden miteinander inkubiert, beschallt und anschließend wieder mit Hirnhomogenat gesunder Hamster gemischt. Nach wiederholten Amplifikations- und Verdünnungsschritten erhält man ausschließlich neu gebildetes PrP^{Sc}.

Literatur

- Baskakov, I.V., G. Legname, M.A. Baldwin und S.B. Prusiner.** 2002. Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J. Biol. Chem.* **277**:21140-21148.
- Buschmann, A., E. Pfaff, K. Reifenberg, H.M. Müller und M.H. Groschup.** 2000. Detection of cattle-derived BSE prions using transgenic mice overexpressing bovine PrP(C). *Arch. Virol. Suppl.* **16**:75-86.
- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz und C. Soto.** 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**:195-206.
- Castilla, J., P. Saa und C. Soto.** 2005. Detection of prions in blood. *Nature medicine* **11**:982-985.
- Hsiao, K.K., D. Groth, M. Scott, S. Yang, H. Serban, D. Rapp, D. Foster, M. Torchia, S.J. DeArmond und S.B. Prusiner.** 1994. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:9126-9130.
- Jackson, G.S., L.L.P. Hosszu, A. Power, A.F. Hill, J. Kenney, H. Saibil, C.J. Craven, J.P. Waltho, A.R. Clarke und J. Collinge.** 1999. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* **283**:1935-1937.
- Legname, G., I.V. Baskakov, H.B. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. DeArmond und S.B. Prusiner.** 2004. Synthetic mammalian prions. *Science* **305**:673-676.
- N.N.** 2005. News Focus. Waiting for the final experiment. *Science* **310**:1758.
- Saborio, G.P., B. Permann und C. Soto.** 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**:810-813.
- Weissmann, C.** 1999. Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Biol. Chem.* **274**:3-6.

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen:

Die Salmonellose der Rinder in der Bundesrepublik Deutschland

Methner, U.*

Einleitung

Salmonellosen der Rinder sind perakut bis chronisch verlaufende zyklische Infektionskrankheiten, die meist bei Kolostral- und Tränkmilchkälbern, aber auch bei Kühen um den Zeitraum des Abkalbens auftreten. Als Krankheitserscheinungen werden Durchfallerkrankungen mit Todesfällen, fieberhafte Bronchopneumonien, Arthritiden sowie Aborte ab dem 7. Trächtigkeitsmonat beobachtet.

Die Salmonellose der Rinder ist eine nach dem Tierseuchengesetz anzeigepflichtige Erkrankung. Die „Verordnung zum Schutz gegen die Salmonellose der Rinder“ (Rinder-Salmonellose-Verordnung) in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. November 1991 (BGBl. I S. 2118) definiert, wann ein Verdacht und wann eine amtliche Feststellung der Salmonellose in einem Rinderbestand auszusprechen sind und welche Maßnahmen eingeleitet werden müssen. Die „Allgemeine Verwaltungsvorschrift über Tierseuchennachrichten“ vom 24. November 1994 (Gem. Min. Bl. S. 1245) legt fest, dass die zuständigen Behörden dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz das Auftreten anzeigepflichtiger Tierseuchen mittels elektronischer Datenübertragung unter Verwendung des EDV-Programms „Tierseuchennachrichten“ (TSN) mitteilen.

Eine Erfassung der amtlich festgestellten Ausbrüche von Salmonellose der Rinder erfolgt in der Bundesrepublik Deutschland seit dem 01.01.1995 über das Nationale Tierseuchennachrichtensystem (Kroschewski et al., 1996). Diese Daten sollen genutzt werden, um die Situation der Rinder-Salmonellose in der Bundesrepublik Deutschland von 1995 bis 2003 darzustellen. Obwohl die Informationen zu den Ausbrüchen im Tierseuchennachrichtensystem bestimmten Schwankungen unterliegen können und man trotz Anzeigepflicht auch von einer nicht einzuschätzenden Dunkelziffer nicht angezeigter Ausbrüche an Rinder-Salmonellose ausgehen muss (Hüttner und Seelmann, 2003), erlauben die für 1995 - 2003 vorliegenden Informationen Aussagen über die Salmonellose-Situation in der Bundesrepublik Deutschland und den Bundesländern.

Datenerfassung

Als Basis für die Darstellung der Situation der Rindersalmonellose in der Bundesrepublik Deutschland dienen die im Nationalen Tierseuchennachrichtensystem (TSN) erfassten Angaben. Daher erstreckt sich der Untersuchungszeitraum von 1995 (Etablierung des TSN) bis 2003. Die durch die zuständigen Behörden als Einzelfallmeldung nach der Seuchenfeststellung mitzuteilenden Angaben werden durch die im Nationalen Tierseuchennachrichtensystem eingerichteten Eingabefelder vorgegeben und umfassen bei der Salmonellose der Rinder folgende Informationen: Tag der amtlichen Feststellung bzw. Aufhebung, Bundesland, Kreis, Gemeinde, Erreger, Untersuchungsgrund und angewandtes Diagnoseverfahren. Weiterhin werden Angaben zu den Tierarten des Seuchenobjektes, zum Einschleppungsweg und zu den eingeleiteten Maßnahmen im Bestand erhoben.

Diese Informationen wurden genutzt, um die Situation der Rinder-Salmonellose in der Bundesrepublik Deutschland und den Bundesländern, in denen Salmonellose-Fälle mitgeteilt wurden (BB = Brandenburg, BW = Baden - Württemberg, BY = Bayern, HE = Hessen, MV = Mecklenburg - Vorpommern, NI = Niedersachsen, NW = Nordrhein-Westfalen, RP = Rheinland-Pfalz, SH = Schleswig-Holstein, SN = Sachsen, ST = Sachsen-Anhalt, TH = Thüringen), darzustellen. Schwerpunkte bei der Zusammenfassung der Daten sind der zeitliche Verlauf des Auftretens der Salmonellose-Feststellungen, die nachgewiesenen *Salmonella*-Serovaren bzw. deren prozentuale Anteile in den Bundesländern sowie der Bundesrepublik und die eingeleiteten Maßnahmen nach Feststellung der Salmonellose. Andere Angaben wie Untersuchungsgrund (= diagnostische Untersuchung) und das angewandte Untersuchungsverfahren (= bakteriologische Erregerisolierung) sind bei nahezu allen angezeigten Einzelfällen identisch und erlauben daher keine differenzierte Betrachtung.

Anzahl der Salmonellose-Ausbrüche

Die Anzahl der angezeigten Ausbrüche an Salmonellose der Rinder in Deutschland von 1995 bis 2003 betrug im Mittel $221,2 \pm 26,5$ (Abb. 1). Da sich die Zahl der Betriebe mit Rindern in diesem Zeitraum von 305.000 auf 232.000 verringerte (Statistisches Bundesamt 1996 - 2004), erhöhte sich die Anzahl der angezeigten Ausbrüche an Rindersalmonellose im Verhältnis zur Anzahl der Betriebe mit Rindern signifikant ($p \leq 0,05$). Diese Situation gilt übereinstimmend für die ost- bzw. westdeutschen Bundesländer. Von 1995 bis 2000 (danach liegen keine Angaben zur Anzahl der Halter von Rindern für diese Kategorien vor) erhöhte sich die Anzahl der angezeigten Ausbrüche an Rindersalmonellose im Verhältnis zur Anzahl der Betriebe mit Rindern sowohl in den ostdeutschen als auch den westdeutschen Bundesländern insgesamt signifikant ($p \leq 0,05$). In den ostdeutschen Bundesländern war die Anzahl an Ausbrüchen pro Rinderbestand in diesem Zeitraum jedoch 6 bis 8 mal höher (signifikant, $p \leq 0,05$) als in den westdeutschen Bundesländern.

Es gibt zwar in den Bundesländern Schwankungen in der Anzahl der jährlich gemeldeten Ausbrüche, aber eine über mehrere Jahre erfolgende Entwicklung ist seit 1998 (Abb. 3, 4) nur für Niedersachsen, mit einem seit 2001 bis 2003 erfolgenden Anstieg der gemeldeten Ausbrüche von 34 bis auf 86 zu verzeichnen (Methner, 2003, 2004).

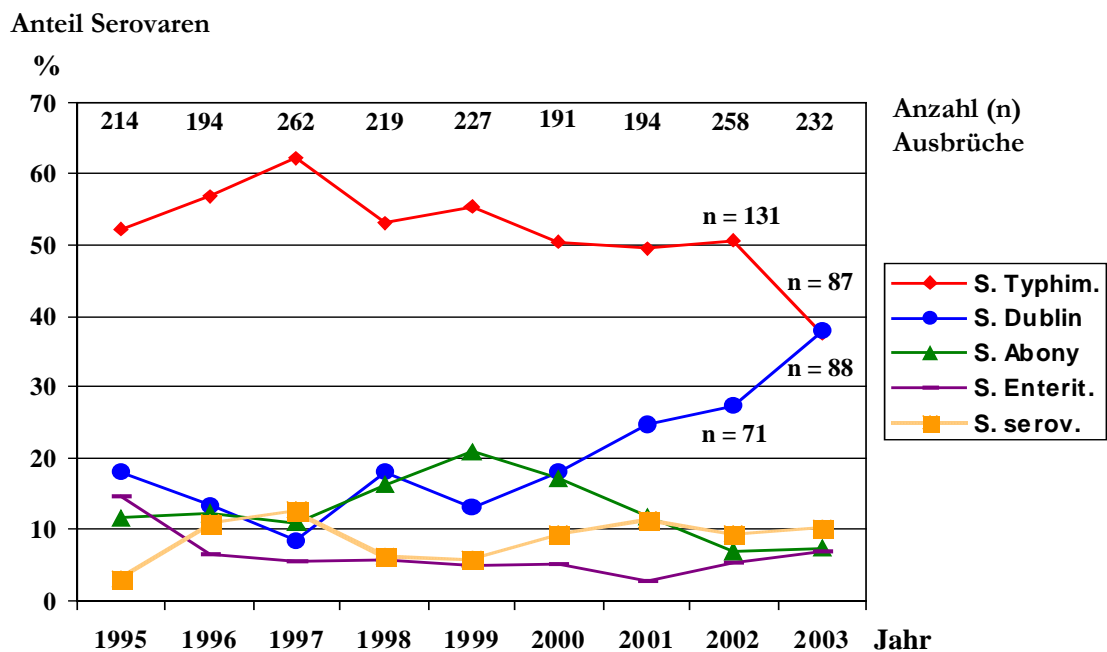


Abb. 1: Anzahl der Rinder-Salmonellose-Ausbrüche in der Bundesrepublik Deutschland von 1995 bis 2003 und die nachgewiesenen *Salmonella*-Serovaren

Zeitliche Verteilung der angezeigten Rinder-Salmonellosen

Die zeitliche Verteilung der jährlich angezeigten Rinder-Salmonellose-Ausbrüche weist von 1995 bis 2003 eine sehr große Übereinstimmung auf (Abb. 2). Die geringste Zahl von Neuausbrüchen wird jährlich in den Monaten April/Mai festgestellt. Danach kommt es zu einem kontinuierlich erfolgenden Anstieg bis September/Oktober. In diesen Monaten gelangen deutschlandweit jährlich ca. 30 Neuausbrüche zur Anzeige. Anschließend wird ein Rückgang der monatlichen Salmonellose-Ausbrüche beobachtet, der sich bis April/Mai fortsetzt. In diesen Monaten lag die Anzahl von Neuausbrüchen in den letzten Jahren unter zehn. Diese saisonale Verteilung der Salmonellose-Fälle beim Rind wird auch in Großbritannien (VLA, 2003) und, wenn auch ohne direkten kausalen Zusammenhang, z.B. auch für die jährlich gemeldeten *Salmonella*-Infektionen des Menschen in der Bundesrepublik Deutschland (RKI, 2004) und zahlreichen anderen europäischen Staaten beobachtet (Browning et al., 2002; EC, 2004; VLA, 2003).

Anzahl Ausbrüche

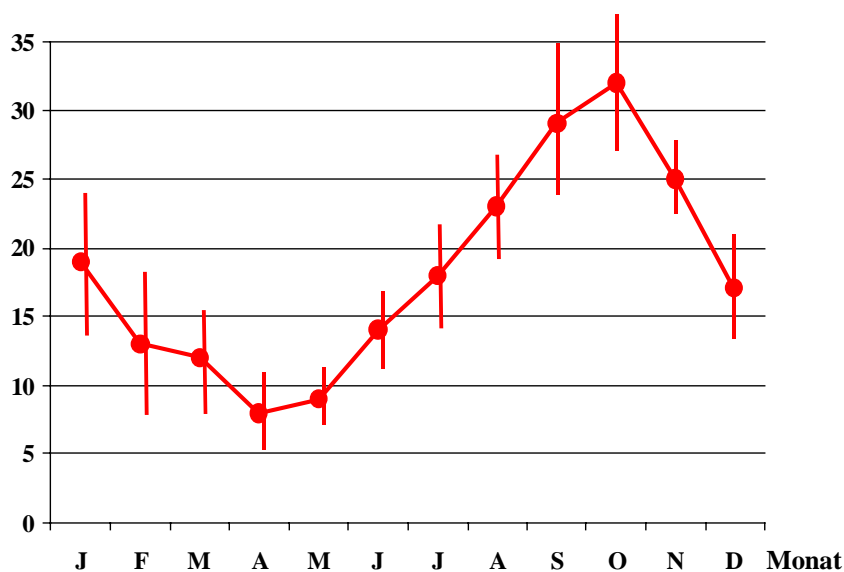


Abb. 2: Zeitliche Verteilung ($\bar{x} \pm s$) der Rinder-Salmonellose-Ausbrüche in der Bundesrepublik Deutschland von 1995 - 2003

Nachgewiesene *Salmonella*-Serovaren und geographische Verteilung

Die für die gemeldeten Ausbrüche an Salmonellose der Rinder verantwortlichen *Salmonella*-Serovaren sind für die Bundesrepublik Deutschland und die einzelnen Bundesländer in den Abbildungen 1, 3 und 4 dargestellt. *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Typhimurium variatio copenhagen (serologische Minusvariante von *Salmonella* Typhimurium) zusammengefasst sind von 1995 bis 2002 mit einem Anteil von ca. 50 % an den gemeldeten Ausbrüchen die Hauptursache für die Salmonellose der Rinder in Deutschland (Abb. 1). Von diesen entfallen im Durchschnitt der Jahre ca. 4/5 der Fälle auf *Salmonella* Typhimurium und ca. 1/5 auf *Salmonella* Typhimurium variatio copenhagen.

Im Jahre 2003 wurde ein deutlicher Rückgang dieser *Salmonella*-Serovaren auf einen Anteil von insgesamt 38 % festgestellt (131 Ausbrüche in 2002, 87 Ausbrüche in 2003). Die geringere Anzahl festgestellter *Salmonella*-Typhimurium-Ausbrüche im Jahre 2003 ist nicht auf den Rückgang der Fälle in nur einzelnen Bundesländern zurückzuführen, sondern trat in HE, MV, SN, RP und besonders deutlich in BW, NW und TH auf (Methner, 2004).

Der von 1995 bis 2002 insgesamt in Deutschland beobachtete hohe Anteil von *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Typhimurium variatio copenhagen wird mehrheitlich auch in den Bundesländern festgestellt (Abb. 3, 4). In allen Bundesländern außer in BY (47 %), NI (36 %) und SH (35 %) wurden von 1995 bis 2003 mehr als 50 % der Salmonellose-Ausbrüche durch diese beiden Serovaren hervorgerufen. Demzufolge besitzen *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Typhimurium variatio copenhagen mit Ausnahme von NI und SH deutschlandweit die größte Bedeutung als Ursache für die Salmonellose der Rinder. Seit 1995 reduzierte sich der Anteil der durch *Salmonella* Typhimurium verursachten Ausbrüche außer in NI und SH in geringerem Umfang auch in MV und SN.

Im Rahmen des TSN erfolgt keine weitere Differenzierung der ausbruchsverursachenden *Salmonella*-Typhimurium-Stämme. Es kann jedoch vermutet werden, dass der oftmals mehrfachresistente (Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin/Spectinomycin, Sulphonamide, Tetracyclin) Phagentyp DT 104 von *Salmonella* Typhimurium für den größten Anteil der *Salmonella*-Typhimurium-Infektionen bei Rindern verantwortlich ist, da dieser Phagentyp bei der Mehrzahl (ca. 70 % bis 80 %) der an das Nationale Referenzlabor Salmonellen zur Typisierung eingesandten Isolate vom Rind diagnostiziert wird (Dorn et al., 2002; Schroeter et al., 2003).

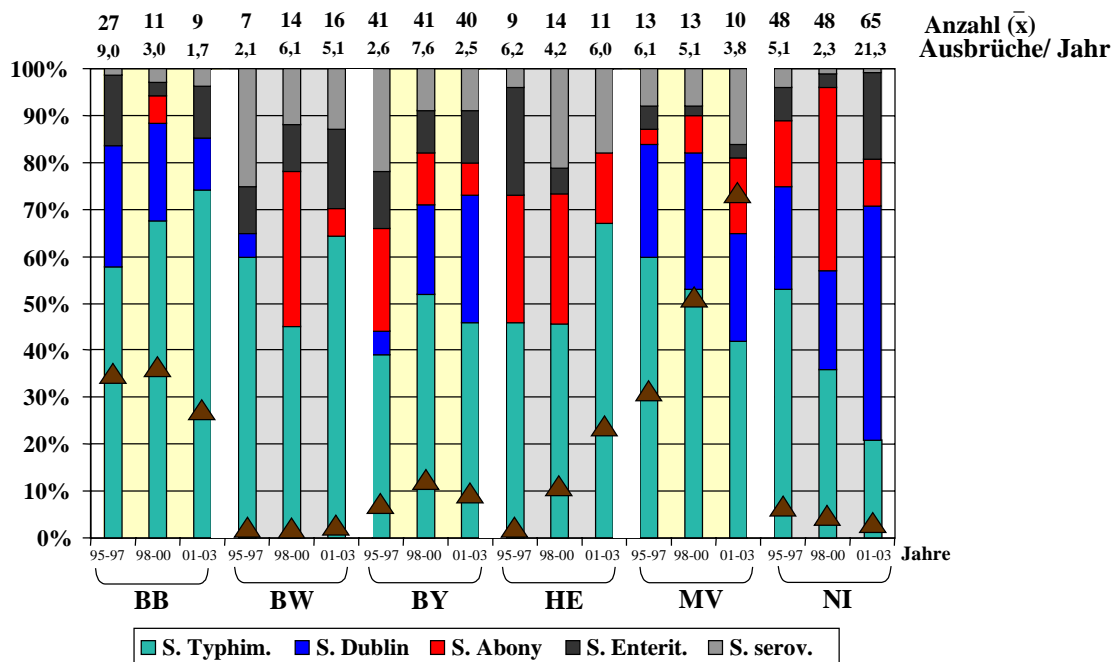


Abb. 3: Anteil (%) der *Salmonella*-Serovaren an Gesamt-Ausbrüchen in den Bundesländern BB, BW, BY, HE, MV, NI und Anteil (%) der Ausbrüche mit nachfolgender Immunisierung des Bestandes (▲)

Die an das Rind adaptierte Serovar *Salmonella Dublin* wurde von 1995 bis 2000 bei ca. 15 % bis 20 % der gemeldeten Ausbrüche nachgewiesen (Abb. 1). Seit 2000 kam es anteilig zu einem kontinuierlichen Anstieg der durch *Salmonella Dublin* verursachten Rinder-Salmonellose-Ausbrüche in Deutschland, im Jahre 2003 verursachte diese Serovar mit einem Anteil von 38 % genauso viele amtlich festgestellte Ausbrüche wie *Salmonella Typhimurium*.

Im Vergleich zu *Salmonella Typhimurium* gibt es beim Nachweis von *Salmonella Dublin* erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Bundesländern (Abb. 3, 4). Die Tatsache, dass die an das Rind adaptierte Serovar Dublin in einigen Bundesländern nicht (HE, RP) oder nur sehr selten (BW, NW) nachgewiesen wird und z.B. in NI und besonders SH mit steigender Tendenz den größten Anteil der gemeldeten Rinder-Salmonellose-Ausbrüche verursacht, ist ein Hinweis darauf, dass diese Serovar in einigen Bundesländern tatsächlich nur ausnahmsweise oder gar nicht vorkommt, speziell in SH und NI jedoch Bedingungen vorliegen, die eine relativ schnelle Ausbreitung ermöglichen. Es ist aber nicht bekannt, ob Neu- oder Wiederausbrüche in diesen Regionen durch eine bestehende Erregerpersistenz oder durch einen Erregerimport aus anderen Gebieten verursacht werden.

Der seit 2000 gestiegene Anteil an *Salmonella Dublin*-Infektionen in Deutschland ist insbesondere auf den Anstieg der Ausbrüche in NI (2001: 13 Ausbrüche, 2002: 51 Ausbrüche, 2003: 52 Ausbrüche) und SH (2001: 7 Ausbrüche, 2003: 16 Ausbrüche) zurückzuführen (Methner, 2004). Diese Länder weisen die höchsten Anteile der durch *Salmonella Dublin* festgestellten Ausbrüche auf.

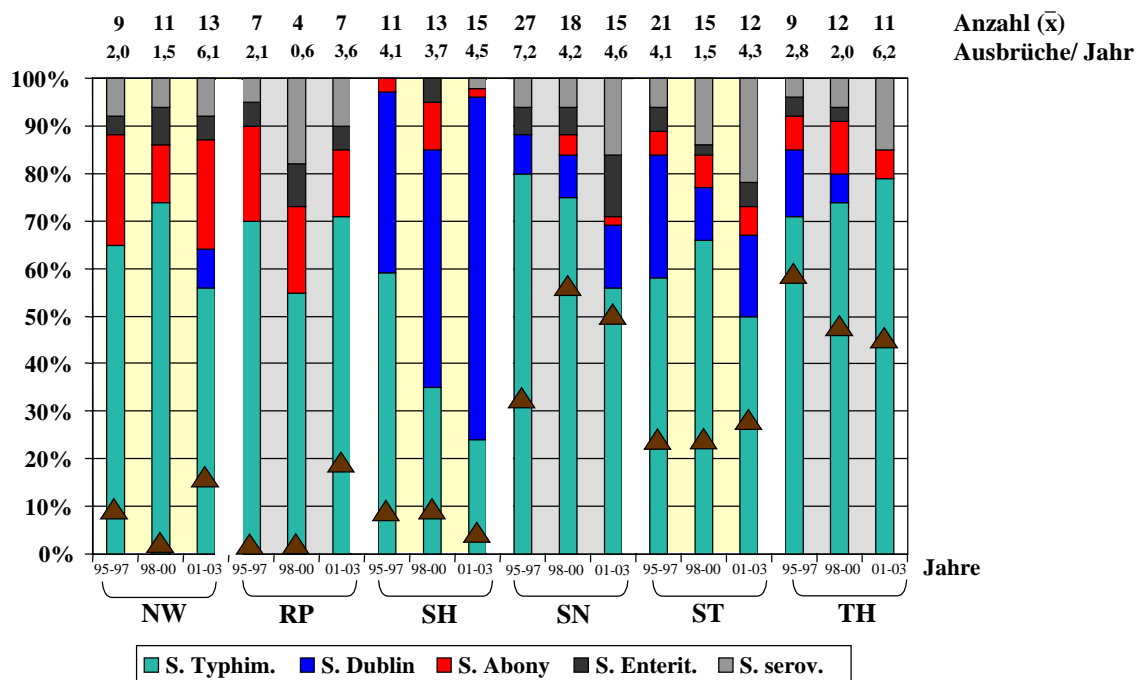


Abb. 4: Anteil (%) der *Salmonella*-Serovaren an Gesamt-Ausbrüchen in den Bundesländern NW, RP, SH, SN, ST, TH und Anteil (%) der Ausbrüche mit nachfolgender Immunisierung des Bestandes (▲)

Die Serovar *Salmonella Abony* (Antigenformel O: 1, 4, [5], 12, 27; H: b; e, n, x), frühere Bezeichnung *Salmonella Abortus-bovis*, verursachte von 1995 bis 2003 in Deutschland 7 % bis 21 % der angezeigten Ausbrüche (Abb. 1). Dabei ist ein anteilmäßiger Rückgang der Ausbrüche von 21 % im Jahr 1999 auf 7 % im Jahr 2003 zu verzeichnen. Das Vorkommen der Serovar *Salmonella Abony* weist ein Gefälle zwischen den westdeutschen und ostdeutschen Bundesländern auf. Während diese Serovar im Beobachtungszeitraum von 1995 bis 2003 zusammengefasst in allen westdeutschen Bundesländern mehr als 15 % der angezeigten Ausbrüche verursachte, wurde sie in den ostdeutschen Bundesländern bei weniger als 10 % der Salmonellose-Ausbrüche als Ursache identifiziert (Abb. 3, 4).

Salmonella Enteritidis verursachte von 1996 bis 2003 deutschlandweit sehr konstant einen Anteil von ca. 5 % bis 6 % der angezeigten Rinder-Salmonellosen (Abb. 1). Diese Serovar wurde in allen Bundesländern diagnostiziert. Es gibt zwar für die Bundesrepublik insgesamt weder eine deutliche Tendenz zu einer Erhöhung noch zu einer Verringerung der gemeldeten Fälle, aber in HE, SH und TH wurden von 2000 bis 2003 keine Ausbrüche durch *Salmonella*-Enteritidis verursacht (Abb 3, 4). Eine wie z.B. beim Geflügel nachgewiesene Ausbreitung dieser Serovar wird beim Rind nicht beobachtet.

Im Rahmen des TSN erfolgt wie bei *Salmonella Typhimurium* keine weitere Differenzierung der ausbruchsverursachenden *Salmonella*-Enteritidis-Stämme. Es kann jedoch vermutet werden, dass der auch bei anderen Tierarten und verschiedenen Lebensmitteln in Deutschland dominierende Lysotyp PT 4 auch für *Salmonella*-Enteritidis-Infektionen bei Rindern verantwortlich ist, da dieser Phagentyp bei einem hohen Prozentsatz der an das Nationale Referenzlabor Salmonellen zur Typisierung eingesandten Isolate vom Rind diagnostiziert wird (Dorn et al., 2002; Schroeter et al., 2003).

Die in den Abbildungen 1, 3 und 4 aufgeführte zusammengefasste Gruppe der *Salmonella*-Serovaren verursachte von 1995 bis 2003 in Deutschland insgesamt ca. 8 % bis 10 % der angezeigten Salmonellose-Ausbrüche. Diese Gruppe setzt sich aus wenigen nicht vollständig typisierten Isolaten und aus zahlreichen typisierten Serovaren zusammen, die jedoch jede für sich nur für einen sehr geringen Anteil der Rinder-Salmonellose-Ausbrüche verantwortlich sind. Neben der Gruppe der nicht vollständig typisierten Serovaren (ca. 6 bis 10 Ausbrüche/ Jahr) werden in Deutschland nur durch *Salmonella Infantis* (1 bis 5 Ausbrüche) und durch *Salmonella Agona* (1 bis 2 Ausbrüche) fast jedes Jahr Neuausbrüche verursacht.

Von 1995 bis 2003 wurden bei insgesamt 77 Rinder-Salmonellose-Ausbrüchen in Deutschland insgesamt 51 weitere typisierte Serovaren als Ursache festgestellt. Darunter fällt eine Häufung von 16 Ausbrüchen durch *Salmonella Rostock* in den Jahren 1995 und 1996 in Bayern. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass

diese *Salmonella*-Serovaren von 1995 bis 2003 jeweils fast ausschließlich nur einen festgestellten Ausbruch verursacht haben und nicht zu wiederholten Fällen führten. In jedem Jahr wurde eine „jahresspezifische“ Gruppe von fünf bis sieben *Salmonella*-Serovaren bei Ausbrüchen nachgewiesen, die in den anderen Jahren des Beobachtungszeitraumes nicht noch einmal zu einem angezeigten Ausbruch führte. Eine Entwicklung zu einem Anstieg einzelner Serovaren dieser Gruppe ist derzeit nicht erkennbar.

Beziehung zwischen Dauer der Bestandssperre, Bestandsgröße und verursachender *Salmonella*-Serovar

Nach amtlicher Feststellung der Rinder-Salmonellose in einem Bestand wird entsprechend der Rinder-Salmonellose-Verordnung eine Bestandssperre ausgesprochen, die den möglichen Handel mit infizierten Tieren verhindern soll. Die Dauer der Bestandssperre bei den Ausbrüchen variiert zwischen wenigen Tagen und mehr als einem Jahr. Ein Vergleich zwischen der Dauer der Bestandssperre und der Größe des Bestandes (Tierzahl) aller angezeigten Ausbrüche ergab, dass keine Beziehung zwischen diesen Daten-Gruppen besteht. Der Korrelationskoeffizient lag in den einzelnen Jahren des Untersuchungszeitraums zwischen 0,198 und 0,244. Ein Vergleich der Rangzahlen (Steinbach, 1983) für die Dauer der durchschnittlichen Bestandssperre in den einzelnen Bundesländern und für die durchschnittlichen Bestandsgrößen zeigte jedoch, dass die Bundesländer mit den größten Beständen (SN, TH, MV, BB, ST) mehrheitlich auch die längsten Bestandssperren aufweisen. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Rangzahlen aller Bundesländer betrug jedoch ebenfalls nur 0,678. Daher kann geschlussfolgert werden, dass neben der Bestandsgröße vermutlich zahlreiche weitere Faktoren die Dauer der Bestandssperre beeinflussen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob es eine Beziehung zwischen den ausbruchsverursachenden *Salmonella*-Serovaren und der Dauer der Bestandssperre gibt. Im gesamten Untersuchungszeitraum von 1995 bis 2003 betrug die Krankheitsdauer bei Ausbrüchen durch *Salmonella* Typhimurium 87,1 Tage, durch *Salmonella* Dublin 66,2 Tage, durch *Salmonella* Enteritidis 69,4 Tage, durch *Salmonella* Abony 74,2 Tage und durch die Gruppe der anderen *Salmonella*-Serovaren 79,5 Tage. Damit führten die durch *Salmonella* Typhimurium verursachten Ausbrüche insgesamt zu den längsten Bestandssperren, die signifikant ($p \leq 0,05$; Standardfehler der Krankheitsdauer 5,28; ANOVA) größer war als die durch *Salmonella* Dublin und *Salmonella* Enteritidis hervorgerufenen Fälle. Weitere signifikante Unterschiede in der Dauer der Bestandssperre in Abhängigkeit von der Serovar bestanden nicht. Der insgesamt hohe Anteil von *Salmonella* Typhimurium an den angezeigten Ausbrüchen (Abb. 1) und auch die Dauer der dabei auftretenden Bestandssperre unabhängig von der Bestandsgröße bestätigen die besondere Bedeutung von *Salmonella* Typhimurium bei der Salmonellose des Rindes (Wray und Davies, 2000). Bei Betrachtung der Dauer der Bestandssperre wird jedoch auch deutlich, dass weniger invasive und damit auch weniger virulente Serovaren als Typhimurium, Dublin oder Enteritidis lang dauernde Ausbruchsgeschehen auslösen können. Daher wird die jeweilige Dauer der Bestandssperre von zahlreichen Faktoren bestimmt werden und nicht auf einzelne Einflussgrößen zurückzuführen sein.

Andere im TSN zu erfassende Informationen erlauben keine weitere Auswertung, weil sie entweder bei nahezu allen Ausbrüchen identisch sind (Untersuchungsgrund ist die diagnostische Untersuchung, Untersuchungsverfahren ist die bakteriologische Erregerisolierung) oder nicht aufgeführt werden (Untersuchung weiterer Tierarten im Betrieb, Eintragsquelle).

***Salmonella*-Immunisierungen**

Zu den bei einem Ausbruch an Rinder-Salmonellose in einem Bestand zu erfassenden Angaben im TSN gehören auch die eingeleiteten Maßnahmen nach amtlicher Feststellung. Neben Bestandssperre, Handelsverbot, Beschränkung des Personenverkehrs, Reinigung und Desinfektion, die bei nahezu allen angezeigten Einzelfällen angegeben sind, wird auch die Immunisierung der empfänglichen Tiere des Bestandes aufgeführt.

Gegen die Serovaren *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Dublin sind für den Einsatz bei Kälbern bis zu einem Alter von sechs Wochen kommerzielle oral zu applizierende *Salmonella*-Lebendimpfstoffe verfügbar. Darüber hinaus steht ein kommerzieller parenteral zu verabreichender *Salmonella*-Typhimurium-Inaktivimpfstoff für den Einsatz bei älteren Tieren zur Verfügung. Beim Nachweis anderer *Salmonella*-Serovaren können stallspezifische Inaktivimpfstoffe hergestellt und bei Tieren über sechs Wochen eingesetzt werden.

Obwohl aus den im TSN aufgeführten Maßnahmen nach der amtlichen Feststellung auch die Immunisierung des Bestandes angegeben wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in bestimmten Betrieben

auch schon vor der Feststellung der Salmonellose vakziniert wurde. Trotzdem scheinen diese Angaben den bereits beschriebenen Trend (Holubek und Selbitz, 2002) zu bestätigen, dass eine Immunisierung des Bestandes erst nach der Feststellung des Infektionsgeschehens erfolgt. Damit wird die eigentliche Zielstellung der Immunisierung gegen *Salmonella*-Infektionen des Rindes, d. h. die prophylaktische Anwendung der Impfung, durch den Einsatz als Notimpfung verdrängt (Holubek und Selbitz, 2002).

Bei der Anwendung von Impfungen nach Feststellung der Salmonellose in einem Bestand nach den Angaben im TSN gibt es zwischen den ostdeutschen und westdeutschen Bundesländern große Unterschiede (Abb. 3, 4). In allen westdeutschen Bundesländern wurde im Zeitraum von 1995 bis 2003 bei weniger als 10 % der angezeigten Salmonellose-Ausbrüche eine Immunisierung des Bestandes durchgeführt. In HE, NW und RP ist seit 2001 eine ansteigende Tendenz zur Bestandsimpfung nach amtlicher Feststellung erkennbar. In den ostdeutschen Bundesländern wurde im genannten Zeitraum bei 20 % bis 30 % (BB, ST) bzw. ca. 50 % (MV, SN, TH) der angezeigten Rinder-Salmonellosen eine Impfung des Bestandes eingeleitet. Eine Ursache für diese Unterschiede ist sicher darin zu sehen, dass flächendeckende prophylaktische Immunisierungen gegen die Serovaren *Salmonella* Dublin und *Salmonella* Typhimurium in den ostdeutschen Bundesländern bereits seit 1980 (Meyer et al., 1980) angewandt wurden und sowohl zu einer beträchtlichen Reduzierung der *Salmonella*-Nachweise bei Rindern als auch der jährlich angezeigten Neuausbrüche an Rinder-Salmonellose führten (Meyer et al., 1993). Trotz dieser früheren Ergebnisse ist davon auszugehen, dass derzeit bundesweit nur noch ausnahmsweise prophylaktische Immunisierungen in Rinderbeständen erfolgen. Da ein Teil der jährlich angezeigten Neuausbrüche wiederholt in bestimmten Gebieten festgestellt werden (Abb. 5), besteht die Möglichkeit, dass die wichtigsten Serovaren wie *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Dublin dort endemisch vorkommen. Das könnte auch eine Ursache für den seit 1999 in einigen Bundesländern beobachteten Anstieg an *Salmonella*-Dublin-Ausbrüchen sein (Methner, 2004). Daher sollte bei nachgewiesenem endemischem Auftreten von *Salmonella* Dublin und *Salmonella* Typhimurium in bestimmten Regionen auch der prophylaktische Einsatz von Immunisierungen berücksichtigt werden.



Abb. 5: Geographische Verteilung der Rinder-Salmonellose-Ausbrüche in der Bundesrepublik Deutschland

Infektionsquellen für die Rinder-Salmonellosen und Schlussfolgerungen für die Bekämpfung

Im Rahmen des TSN sollen auch Informationen über die Einschleppungswege der Erreger erfasst werden. Die Auswertung dieser Angaben zeigt jedoch ganz eindeutig, dass der Einschleppungsweg fast nie ermittelt und nur ausnahmsweise vermutet werden kann. Die Hauptursache dafür besteht sicher darin, dass vom Zeitpunkt des Erregereintrags in den Bestand bis zur Feststellung der Salmonellose ein unterschiedlich langer Zeitraum liegen kann. In dieser Zeit kann sich der Erreger, insbesondere wenn er keine auffälligen klinischen Krankheitserscheinungen bei den Tieren hervorruft, im gesamten Bestand ausbreiten. Da der Eintrag von Salmonellen aus der Umwelt in den Bestand auf jeder Produktionsebene und aus zahlreichen Quellen erfolgen kann, ist es nach einer Ausbreitung im Bestand oft sehr schwierig, die primäre Infektionsquelle zu identifizieren. Um gezielte Bekämpfungsmaßnahmen nach der Feststellung der Salmonellose einleiten zu können, ist es daher wichtiger, eine Bestandsanalyse zur Identifizierung der Ursachen für das Zirkulieren der Salmonellen im Bestand durchzuführen. Eine wirksame Bekämpfung der Salmonellose erfordert, dass der Infektions-Kontaminations-Infektions-Kreislauf unterbrochen wird. In eigenen Analysen hat sich gezeigt, dass der Reproduktionsbereich in den Betrieben eine besondere Bedeutung für die Salmonellenausbreitung besitzt, da in diesem Bereich die für eine Infektion empfänglichsten Tiere zusammentreffen und die Erreger sowohl in den Milchkuh- als auch den Kälberbereich weiter verbreitet werden können. Daher sind effektive hygienische Verfahren zur Erregerverminderung und zur Erregerelimination in diesen Bereichen unerlässlich.

Literatur

- Browning, L.M., J.E. Cola, J.M. Cowden, H. Mather und W.J. Reilly.** 2004. *Salmonella* in Scotland, 2002. SCIEH Weekly Report, **38**:22-28.
- Dorn, Chr., A. Schroeter und R. Helmuth.** 2002. Bericht über die im Jahr 1999 an das Deutsche Nationale Veterinärmedizinische Referenzlabor für Salmonellen eingesandten *Salmonella*-Isolate. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **115**:252-258.
- EC (European Commission).** 2004. Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway 2002. SANCO/29/2004.
- Holubek, R. und H.-J. Selbitz.** 2002. Immunprophylaktische Maßnahmen gegen Rindersalmonellose. Der Prakt. Tierarzt **83**:70-78.
- Hüttner, K. und M. Seelmann.** 2003. Rindersalmonellose in Mecklenburg-Vorpommern, Epidemiologie und Diagnostik. Tagung des Landesverbandes der Tierärzte im öffentlichen Dienst Mecklenburg-Vorpommern, Jürgenstorf, 30. September 2003.
- Kroschewski, K., M. Micklich, H. Schlüter und J. Teuffert.** 1996. Erfahrungen seit Einführung des neuen TierseuchenNachrichten-Systems und Schlussfolgerungen zur Verbesserung der Akzeptanz und Anwenderfreundlichkeit (Stand 27.06.1996). Amtstierärztl. Dienst und Lebensmittelkontr. **III/96**:234-243.
- Methner, U.** 2003. Salmonellose der Rinder. Tiergesundheitsjahresbericht 2001/2002, BMVEL, BFAV, 130-135.
- Meyer, H. et al.** 1980. Bovisaloral[®] „Dessau“ – ein mit der Tränke zu verabreichender Lebendimpfstoff gegen die *S.*-Dublin-Infektion des Kalbes. Mh. Vet. Med. **35**:405-410.
- Meyer, H., H. Koch, U. Methner und G. Steinbach.** 1993. Vaccines in salmonellosis control in animals. Zbl. Bakt. **278**:407-415.
- RKI.** Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003. Robert Koch-Institut 2004.
- Schroeter, A., Chr. Dorn und R. Helmuth.** 2003. Bericht des Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabors für Salmonellen im Jahr 2002. In: Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für 2002, 59-63.
- Steinbach, G.** 1983. Erhöhung des Informationsgehaltes aus Infektionsversuchen durch die stärkere Berücksichtigung des Infektionsverlaufs. Arch. Exper. Vet.-Med. **37**:251-257.
- Statistisches Bundesamt (1996-2004):** Fachserie 3, Reihe 4.
- VLA (2003):** Salmonella in livestock production in Great Britain: 2003 Report www.defra.gov.uk
- Wray, C. und R.H. Davies.** 2000. *Salmonella* infections in cattle. In: Wray, C. und A. Wray. *Salmonella* in domestic animals. CAB International Publishing.

Institut für Molekulare Pathogenese:

Das aviäre Immunsystem und seine Reaktionen bei der *Salmonella*-Infektion

Berndt, A.*, González Carvajal, B., Pieper, J. und Methner, U.

1. Das aviäre Immunsystem

Das Immunsystem des Huhnes unterscheidet sich zum Teil erheblich von dem anderer Tiere. So zeigt das Abwehrsystem des Vogels einige Merkmale, die auf eine Zwischenstellung in der phylogenetischen Reihe zwischen jenem der Amphibien und Reptilien einerseits und dem hochentwickelten Immunsystem der Säuger andererseits hinweisen. Tabelle 1 stellt einige der bekanntesten Unterschiede zwischen dem Immunsystem der Säuger und der Vögel gegenüber.

Tab. 1: Unterschiede zwischen aviärem und mammalem Immunsystem

	Vögel	Säuger
Bursa Fabricii	Organ der B-Zell-Entwicklung und -Reifung	nicht vorhanden (B-Zell-Reifung im Knochenmark und der fetalen Leber)
Immunglobuline	IgA, IgM, IgG (IgY)	IgA, IgM, IgG, IgD, IgE
Lymphknoten	nicht vorhanden (es kommen lediglich überall im Organismus kleine Aggregate lymphoiden Gewebes vor)	häufig vorhanden
Granulozyten	Heterophile (= Neutrophile), Eosinophile, Basophile	Neutrophile, Eosinophile, Basophile
T-Zellen	$\gamma\delta$ - T-Zellen häufig vorhanden (bis zu 50% im peripheren Blut)	$\gamma\delta$ - T-Zellen selten (Maus, Mensch: 2-5% im peripheren Blut)
Haupthisto-kompatibilitäts-komplex (MHC)	einfach	komplex

1.1. Primäre und sekundäre lymphatische Organe der Vögel

In den primären lymphatischen Organen werden die Lymphozyten mit spezifischen Antigenrezeptoren ausgestattet und befähigt, zwischen fremden und körpereigenen Antigenen zu unterscheiden. Wie die Säugetiere besitzen auch die Vögel einen Thymus als primäres lymphatisches Organ der T-Zell-Reifung. Einzigartig beim Huhn als weiteres primäres lymphatisches Organ ist dagegen die Bursa Fabricii. Die Bursa Fabricii ist ein modifizierter Abschnitt der dorsalen Wand der Kloake – des gemeinsamen Ausgangs des intestinalen und urogenitalen Traktes der Vögel. Sie besteht aus Falten oder Plicae (ähnlich den Villi im Darm), die in ein zentrales Lumen ragen und Sitz der lymphoiden Follikel der Bursa sind. Die funktionelle Bedeutung der Bursa Fabricii liegt in der Vermehrung und Entwicklung von immunkompetenten B-Lymphozyten. Im Laufe der Entwicklung des Vogels kommt es zur Involution der Bursa.

Da Vögel im Gegensatz zu den Säugern keine eingekapselten Lymphknoten besitzen, finden sich hier als sekundäre lymphatische Gewebe vorwiegend kleinere lymphozytäre Aggregationen (Nickel et al., 1992). Beim Huhn zählen folgende Strukturen zu den sekundären bzw. peripheren lymphatischen Organen: die

Milz, das *gut*-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT), das Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) sowie das *head*-assoziierte lymphatische Gewebe (HALT) und die muralen Knötchen (wandständig an Lymphgefäßen). Ein Großteil dieses lymphatischen Gewebes befindet sich in den Schleimhäuten und wird dann zusammengefasst als MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) bezeichnet (Sharma, 1998). Das Gewebe der sekundären lymphatischen Organe bildet die Umgebung, in der die Lymphozyten miteinander und mit Antigenen reagieren können. Das GALT spielt insbesondere bei der Abwehr enteritischer *Salmonella*-Infektionen eine zentrale Rolle und soll deshalb später noch näher besprochen werden.

1.2. *Effektoren der aviären Immunantwort*

Die Immunantwort wird im Huhn, genau wie bei den Säugetieren, durch eine Reihe unterschiedlicher Zellen und deren lösliche Mediatoren vermittelt. Zur Unterscheidung der unterschiedlichen Populationen sowie deren Funktionen im Immunsystem werden heute in erster Linie monoklonale Antikörper genutzt. Mit der Einführung der internationalen CD (*cluster of differentiation*)-Nomenklatur wurde ein einheitliches System zur Einordnung der monoklonalen Antikörper und der zellulären Antigene geschaffen. Seit 1991 existiert auch eine CD-Nomenklatur für monoklonale Antikörper gegen aviäre Antigene. Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten Stammzellen ab und differenzieren sich grundsätzlich in zwei Hauptlinien: 1. die lymphatische Reihe, aus der T- und B-Lymphozyten entstehen, und 2. die myeloische Reihe, aus der Phagozyten (Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten) und andere Zellen hervorgehen. Lymphozyten können je nach Herkunft und immunologischer Funktion in zwei Arten eingeteilt werden: die B- und die T-Lymphozyten. Der Name B-Lymphozyten verweist auf die Bursa Fabricii. T-Lymphozyten sind in ihrer Entwicklung Thymus-abhängig. Beide Zelltypen besitzen Oberflächenrezeptoren zur Bindung von Antigenen. Sowohl T- als auch B-Zellen werden nach Antigenbindung aktiviert.

Vergleichbar mit T-Lymphozyten der Säuger sind auch aviäre T-Lymphozyten durch ihren T-Zell-Rezeptorkomplex (TcR-Komplex) charakterisiert, welcher aus dem Antigen-bindenden Rezeptor TcR $\alpha\beta$ (TcR2 $\nu\beta_1$, TcR3 $\nu\beta_2$) bzw. TcR $\gamma\delta$ (TcR1) und dem CD3-Molekül besteht. Die klassischen T-Zell-Marker CD4 und CD8 wurden beim Huhn bereits vor einiger Zeit kloniert (Chan et al., 1988). Die CD4-positiven T_H-Zellen (T_H-Zellen) interagieren mit B-Zellen und helfen diesen sich zu teilen, zu differenzieren und Antikörper zu produzieren. Die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (T_C-Zellen) sind verantwortlich für die Zerstörung von Wirtszellen, die Viren oder andere intrazelluläre Pathogene enthalten. T-Zellen vermitteln ihre Wirkungen entweder durch die Freisetzung löslicher Proteine, Zytokine genannt, oder durch direkte Zell-Zell-Interaktionen.

B-Lymphozyten sind durch ihre Fähigkeit, Immunglobuline (Ig) zu sezernieren, charakterisiert. Die Vögel besitzen im Vergleich zu den Säugetieren nur drei Typen von Immunglobulinen, nämlich IgM, IgG (IgY) und IgA (Davison et al., 1996). Oberflächenimmunglobuline fungieren als spezifische Antigenrezeptoren. Nachdem eine B-Zelle ein spezifisches Antigen erkannt hat, teilt sie sich und differenziert sich zu Plasmazellen. Diese sezernieren große Mengen von Immunglobulinen. Diese Antikörper lassen sich dann im Blut und in Gewebsflüssigkeiten nachweisen. Sie binden das Antigen, das die B-Zelle aktiviert hat.

1.3. *Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT)*

Der Gastrointestinaltrakt beherbergt das größte Kompartiment des Immunsystems und ist damit, entsprechend seiner Funktion als Eintrittspforte für eine Vielzahl verschiedenster Pathogene, der effektivste Teil des aviären Abwehrsystems (Mowat et al., 1997). Die gleichzeitige Präsenz von Nahrungsantigenen erfordert ein fein reguliertes Differenzierungsvermögen des Immunsystems. Wie in anderen peripheren lymphatischen Organen werden im GALT Antigene aufgenommen, in subepitheliale Gewebe transportiert und den Lymphozyten präsentiert, um hier eine adaptive Immunantwort auszulösen. Im Darm findet die Präsentation der über spezielle Zellen aufgenommenen Antigene in der Domregion über den Peyerschen Plaques statt. Sie führt zur Induktion der B- und T-Zellantwort in den Peyerschen Plaques und den lymphoiden Aggregaten (Pastoret et al., 1998).

2. *Salmonellen*

Salmonellen sind gramnegative, begeißelte Stäbchen, die akut bis chronisch oder symptomlos verlaufende Infektionen verursachen können, deren Auftreten bei vielen Vogelarten, Kriechtieren, Säugetieren und

auch beim Menschen beschrieben ist. Von den insgesamt fast 2.500 beschriebenen *Salmonella* (*S.*)-Serovaren besitzen jedoch nur wenige eine besondere Bedeutung als Ursache von Erkrankungen. Die für Mensch und Tier wichtigen *S.*-Serovaren können in wirtsadaptierte (z.B. *S. Typhi* beim Menschen, *S. Gallinarum* beim Geflügel, *S. Dublin* beim Rind, *S. Choleraesuis* beim Schwein) und nicht-wirtsadaptierte (z.B. *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Virchow*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) unterteilt werden. Zu den nicht-wirtsadaptierten *Salmonella*-Serovaren gehören neben zahlreichen weniger virulenten Serovaren auch virulente Serovaren, insbesondere *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*, die sowohl enterale als auch systemische Erkrankungen bei verschiedenen Wirtstieren verursachen können.

Besondere Bedeutung besitzen *S.*-Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren als Ursache für *S.*-Infektionen des Menschen, sie gehören weltweit zu den wichtigsten Zoonosen. Dabei werden in Europa ca. 60% der humanen Infektionen durch vom Geflügel stammende Produkte (vorwiegend *S. Enteritidis*) und ca. 25% durch vom Schwein stammende Produkte (fast ausschließlich *S. Typhimurium*) hervorgerufen.

Auf Grund dieser Situation sind aktive Bekämpfungsprogramme in den Geflügel- und Schweinebeständen notwendig und im Rahmen der Hühner-Salmonellen-Verordnung bzw. der Verordnung (EG) 2160/2003 in Deutschland umgesetzt. Dabei werden neben veterinärhygienischen Maßnahmen in den Tierbeständen zusätzlich umfangreiche Immunisierungsprogramme mit *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* bei Elterntieren der Mast- und Legerichtung sowie bei Legehennen während der Aufzucht durchgeführt.

Unabdingbare Grundlage für eine verbesserte Wirksamkeit von Impfstoffen und Immunisierungsprogrammen bzw. für die Entwicklung neuartiger Impfstoffe ist ein detailliertes Verständnis des aviären Immunsystems, insbesondere der mucosalen Abwehrmechanismen im Magen-Darm-Trakt.

3. *Salmonella*-spezifische immunologische Reaktionen des Huhnes

3.1. Invasion des Darmepithels durch Salmonellen

Nach wie vor sind die Prozesse der Invasion von Salmonellen, der intrazellulären Persistenz, der Verbreitung im Gewebe und der Formierung/Segregation infektiöser Foci im Darmepithel wenig verstanden. Die Aufnahme erfolgt durch spezialisierte Epithelzellen der Darmwand, den M-Zellen (**Abb. 1**; Kraehenbuhl und Neutra, 2000; Ohl und Miller, 2001). Salmonellen sind unter Verwendung des Typ-III-Sekretions-Systems-1 in der Lage, epitheliale Zellen und M-Zellen zu invadieren und über die Expression des sipB Proteins Apoptose in Makrophagen auszulösen. Über den Blutweg erlangen Salmonellen Zugang zu Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES). Unabhängig davon können Salmonellen von dendritischen Zellen auf der mucosalen Oberfläche aufgenommen werden und so die Darmwand passieren (Rescigno et al., 2001).

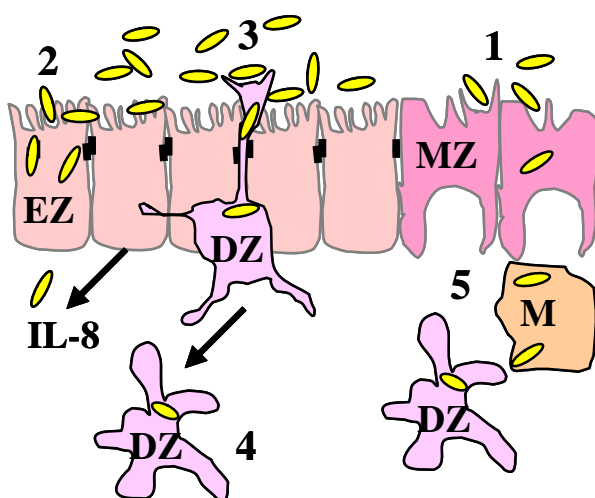


Abb. 1: Es sind zwei Mechanismen der Aufnahme von Salmonellen in die Darmwand beschrieben. Der klassische Weg wird durch M-Zellen (MZ, 1) und Epithelzellen (EZ, 2) vermittelt und beruht auf der Fähigkeit von Salmonellen, aktiv in diese Zellen einzudringen. Der alternative Weg (3, 4) wird durch dendritische Zellen (DZ) vermittelt. Das Zusammentreffen von Salmonellen und Epithelzellen induziert die Sekretion von Chemokinen, wie z.B. dem Lockstoff für Granulozyten IL-8. Bakterien, die über M-Zell-abhängige Mechanismen eintreten, werden letztendlich von Makrophagen (M) und DZ übernommen (5).

Ein weiteres interessantes Phänomen ist die Segregation und Cluster-Bildung von *Salmonella*-infizierten Makrophagen im Gewebe. Diesen Prozess versteht man gegenwärtig als eine präventive Maßnahme zur Verhinderung einer unkontrollierten Verteilung der Bakterien im Körper (Mastroeni und Sheppard, 2004). Die intrazelluläre Persistenz von Salmonellen in Zellen des RES scheint ein wesentlicher Faktor der

Virulenz zu sein. Salmonellen können offensichtlich durch Beeinflussung des Stoffwechsels von reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffintermediaten eine intrazelluläre Abtötung verhindern.

Der Großteil der gegenwärtig verfügbaren Kenntnisse basiert auf Zellkulturuntersuchungen und auf experimentellen Arbeiten mit einem Typhoid-ähnlichen Infektionsmodell der Maus unter Nutzung von *S. Typhimurium*. Die Erkenntnisse aus diesen Versuchen sind auf Grund des unterschiedlichen Infektionsverlaufes nicht einfach auf das Huhn übertragbar. Im Gegensatz zur Maus gibt es zur histologischen Organisation der Bakterieninvasion und Interaktion mit Zellen des Immunsystems im Darmepithel für die *S.*-Typhimurium-Infektion im Huhn bislang keine Erkenntnisse. Die gegenwärtig am Institut für Molekulare Pathogenese laufenden Untersuchungen zur histologischen Verteilung von Salmonellen in der Zäcumwand infizierter Hühnerküken mittels Licht- bzw. Laser-scanning Mikroskopie zeigen erstmals ähnliche Verteilungsmuster mit bakterieller Cluster-Bildung und Serovar-spezifischer Verteilung in der mucosalen Darmwand (**Abb. 2**). Die Zuordnung der Bakterien-Cluster zu bestimmten Zelltypen ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Eine eher geringe Anzahl von Bakterien je Makrophage spricht gegen eine intrazelluläre Vermehrung in diesen Zellen. Eine extrazelluläre Cluster-Bildung scheint ebenfalls vorzukommen.

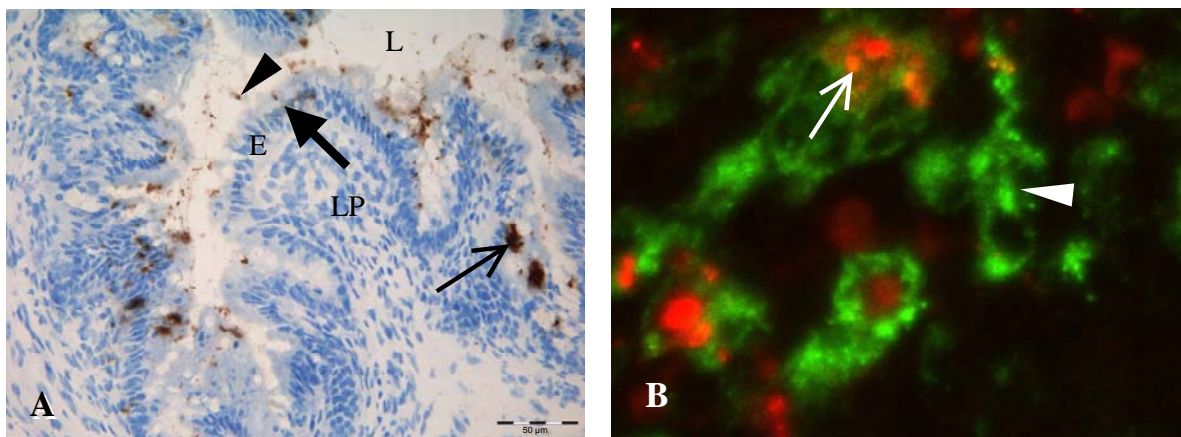


Abb. 2: **A)** Immunhistochemischer Nachweis von *Salmonella* Enteritidis im Zäcum von Eintagsküken 4h nach Infektion (10^7 kbE/Tier, oral). Dünner Pfeil: *Salmonella*-Cluster; dicker Pfeil: einzelne Salmonellen im Epithel; Pfeilkopf: einzelne Salmonellen im Darmlumen; L: Darmlumen; LP: Lamina propria; E: Epithel. **B)** Co-Lokalisation von Salmonellen und Makrophagen im Zäcum von *Salmonella* Enteritidis infizierten Hühnerküken 4d nach Infektion (konfokale Laser-scanning Mikroskopie nach Immunfluoreszenzmarkierung). Darstellung von intrazellulären *Salmonella*-Clustern (dünner Pfeil, rot) und Makrophagen (Pfeilkopf, grün)

3.2. Immunologische Reaktionen auf eine enterale Salmonella-Infektion

Art und Verlauf einer Immunantwort kann man heute über Antikörper-basierte Analyseverfahren (Immunhistochemie, Immunfluoreszenzmarkierungen, Durchflusszytometrie) gut charakterisieren. In Tierexperimenten unter Verwendung von Eintagsküken lassen sich über den Vergleich von Kontrolltieren mit Tieren, die entweder mit Salmonellen infiziert oder über die Verabreichung attenuierter Salmonellen immunisiert wurden, Aussagen über das Wesen der Salmonellen-spezifischen Immunantwort ableiten. Hierbei zeigen sowohl immunisierte als auch infizierte Hühnerküken über einen längeren Zeitraum einen signifikanten Anstieg von $CD8^+/TcR1(\gamma\delta)^+$ -Zellen im Blut. Das $CD4^-$ zu $CD8^-$ -T-Zellverhältnis verschiebt sich bei den infizierten Tieren zugunsten der T-Helfer-Zellen. In den Organen der behandelten Tiere erhöht sich der Anteil von sowohl $CD8^+$ - als auch $TcR1^+$ -T-Zellen, je nach Organ zeitlich versetzt, deutlich (**Abb. 3**). Außerdem finden sich im Vergleich zu den Kontrolltieren im Zäcum infizierter und immunisierter Tiere signifikant mehr $CD4^+$ - und $TcR2(\alpha\beta)^+$ -T-Zellen (Berndt and Methner, 2001).

Zusätzlich zu der beobachteten T-Zell-Reaktion kann auch eine deutliche B-Zell-Reaktion in den Organen nachgewiesen werden. Im Zäcum infizierter und immunisierter Tiere finden sich signifikant mehr IgM- und IgA-produzierende Plasmazellen als bei den entsprechenden Kontrolltieren. In der Bursa Fabricii

immunisierter und infizierter Tiere kommt es dagegen zu einem Abfall des Anteils an IgM⁺-Zellen und Makrophagen, was möglicherweise auf eine besondere Rolle der Bursa Fabricii im Abwehrgeschehen von Hühnerküken gegenüber Salmonellen hinweist (Berndt und Methner, 2004). Die Komplexität der Immunantwort unter Einschaltung sowohl humoraler als auch zellulärer Effektoren spiegelt das Wesen der Salmonellen als extrazelluläre und fakultativ intrazelluläre Bakterien wider. Da die antibakterielle Abwehr insbesondere durch eine Induktion von CD8⁺/TcR1(γδ)⁺-T-Zellen im Blut und in den Organen infizierter und immunisierter Tiere gekennzeichnet ist, scheinen diese Zellen für die Immunantwort bei der *Salmonella*-Infektion eine besondere Rolle zu spielen. Man vermutet, dass diese Zellen zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort vermitteln.

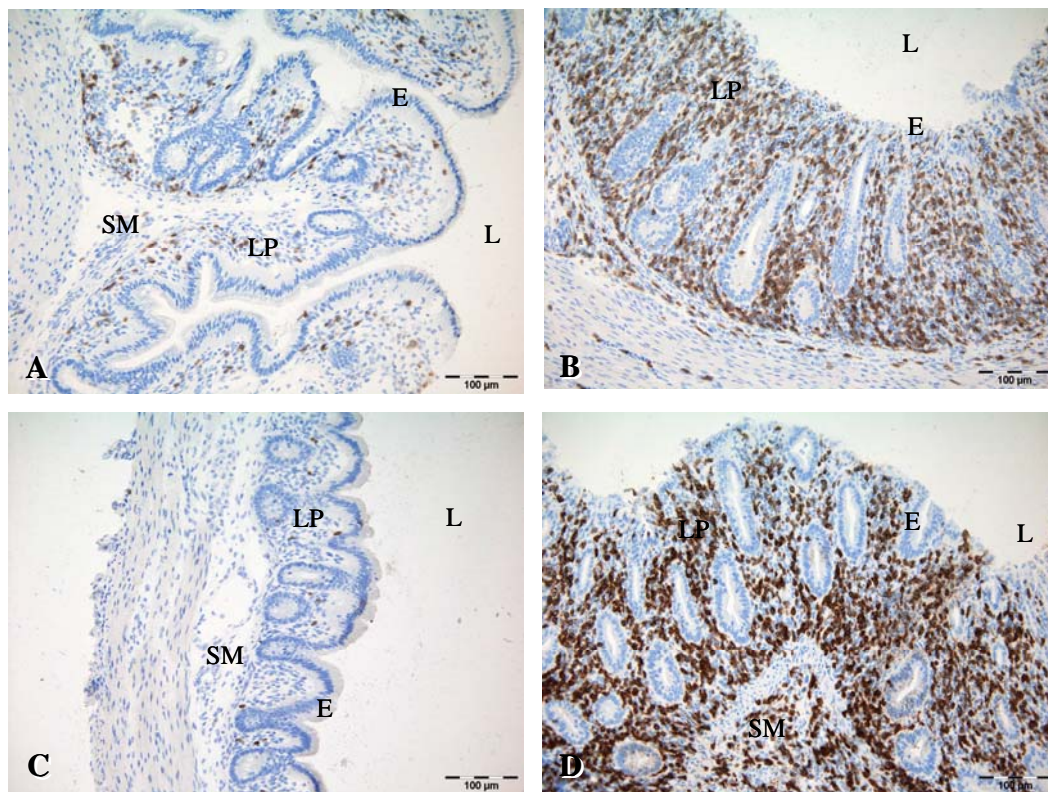


Abb. 3: Immunhistochemischer Nachweis (braun) von CD8⁺- (**A, B**) und TcR1⁺-T-Zellen (**C, D**) im Zäkum von *Salmonella* Enteritidis infizierten (**B, D**) und nicht-infizierten (**A, C**) Hühnerküken 4d, p.i. E: Epithel; LP: Lamina propria; L: Lumen, SM: Submucosa

3.3. T-Zellsubpopulationen und ihre Rolle bei der Salmonella-Infektion

Im peripheren Blut von Hühnern lässt sich, ähnlich wie bei Jungrindern, eine im Vergleich zu anderen Tierarten relativ große Zahl von gamma/delta (γδ)-T-Zellen nachweisen. Daher ist das Geflügel eine geeignete Tierart, um diese Zellpopulation genauer zu untersuchen. Im peripheren Blut von Hühnerküken lassen sich drei durch die unterschiedliche Expression des CD8α-Antigens charakterisierte Subpopulationen von γδ (TcR1⁺)-T-Zellen unterscheiden: (i) stark CD8α-exprimierende γδ-T-Zellen (CD8α^{high}/TcR1⁺-Zellen); (ii) schwach CD8α-exprimierende γδ-T-Zellen (CD8α^{dim}/TcR1⁺-Zellen) und (iii) CD8α-negative γδ-T-Zellen (CD8α⁻/TcR1⁺-Zellen) (**Abb. 4A**; Berndt and Methner, 2004).

Eine weitere phänotypische Charakterisierung der drei definierten γδ-T-Zellpopulationen bezüglich der Expression weiterer Oberflächenantigene (CD4, CD8β, CD28, MHC-II) im Blut von Hühnerküken zeigte, dass insbesondere die CD8α-positive γδ-T-Zellpopulation in Abhängigkeit von der Ausprägung der untersuchten Antigene weiter unterteilt werden kann. So exprimieren ca. 70% der CD8α^{high}/TcR1⁺-Zellen das CD8αβ-Heterodimer und ca. 85% der CD8α^{dim}/TcR1⁺-Zellen das CD8αα-Homodimer (**Abb. 4B**). Außerdem trägt ein geringer Teil der CD8α^{high}/TcR1⁺-Zellen (ca. 30%) zusätzlich das CD28-Antigen. Im Vergleich zu den CD8α-positiven γδ-T-Zellen zeigen die CD8α-negativen γδ-T-Zellen so gut wie keine Expression der hier untersuchten Antigene (Berndt et al., 2005).

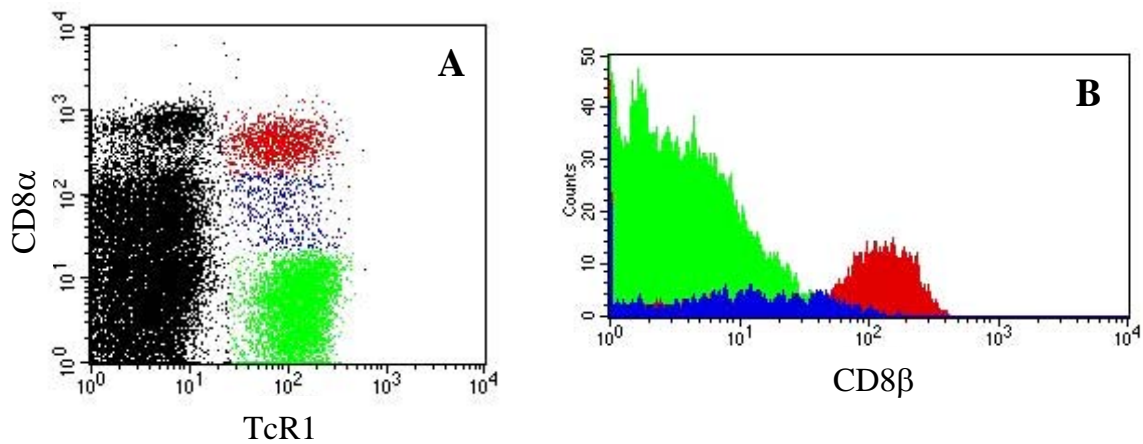


Abb. 4: Grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von peripherem Blut gesunder Hühner (Alter: 44 Tage) bezüglich der CD8 α -Expression von $\gamma\delta$ -T-Zellen (TcR1⁺) (**A**) und der CD8 β -Expression der drei definierten Subpopulationen (**B**): **rot**: stark CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen; **blau**: schwach CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen; **grün**: CD8 α -negative $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Nach Antigenkontakt (z.B. Immunisierung mit *Salmonella*-Lebendvakzin) kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an CD8 α ^{high}/TcR1⁺- und CD8 α ^{high}/TcR1⁺/CD28⁺-T-Zellen. Interessanterweise nimmt aber der Anteil CD8 $\alpha\beta$ -positiver Zellen innerhalb dieser Population ab und die Zahl CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer-tragender Zellen zu (**Abb. 5**). Die Daten verdeutlichen, dass die Population der aviären peripheren CD8 α -positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen eine heterogene und, im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Immunität gegen *Salmonella*, wichtige Zellpopulation darstellt (Berndt et al., 2005). Da für humane CD8 $\alpha\alpha$ -positive Zellen eine Bedeutung für das immunologische „Gedächtnis“ (Memory) nachgewiesen werden konnte, wird die herabgesetzte Expression des CD8 β -Antigens im Zusammenhang mit der Entwicklung einer effizienten aviären T-Memory-Antwort verstanden und ist damit ein für effektive Immunisierungsstrategien wichtiger Prozess.

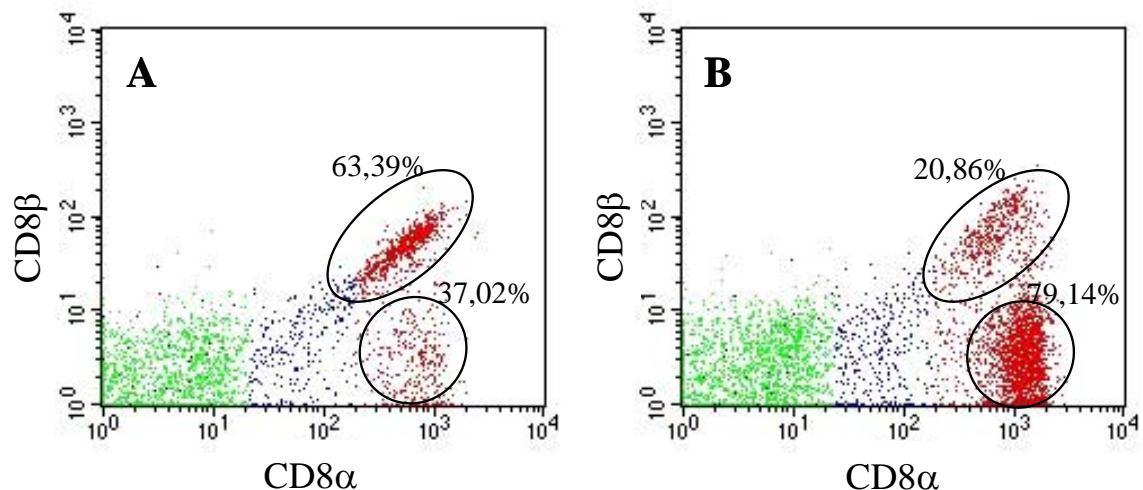


Abb. 5: Grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der CD8 β -Expression von $\gamma\delta$ -T-Zellen von nicht-infizierten (**A**) und mit *Salmonella* Typhimurium infizierten (**B**) Hühnerküken 7d, p.i. (Infektion am 1. Lebenstag, oral). Deutlich wird die relative Zunahme von CD8 $\alpha\alpha$ ⁺- $\gamma\delta$ -T-Zellen (Kreis) im Vergleich zu den CD8 $\alpha\beta$ ⁺- $\gamma\delta$ -T-Zellen (Oval) nach Infektion (B).

3.4. Zytokinexpressionsmuster im Zäkum nach Salmonella-Infektion

Entscheidenden Einfluss auf den Ablauf einer immunologischen Reaktion hat insbesondere das Spektrum der von Immun- und Gewebszellen sezernierten Zytokine und Chemokine. Zytokine sind von Zellen produzierte lösliche Mediatoren, die als Regulatoren und Effektoren der Immunantwort wirken können. Das Spektrum und quantitative Verhältnis der am Invasionsort sezernierten Mediatoren bestimmt dabei den Verlauf und die Effektivität des Immungeschehens. Ein Verständnis für eine spezielle Immunreaktion kann somit immer nur aus der synergistischen Betrachtung der Veränderungen sowohl der zellulären Bestandteile als auch der regulatorischen Botenstoffe erwachsen. Beim Geflügel wurde bereits eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen identifiziert und charakterisiert. Obwohl diese, mit Ausnahme des TGF- β , eine nur geringe Sequenzhomologie zu menschlichen Mediatoren besitzen, zeigen die aviären Zytokine ähnliche immunologische und physiologische Funktionen wie ihre humanen Äquivalente. Sie sind von besonderem Interesse, da man hofft, über einen additiven Einsatz von Zytokinen bzw. Chemokinen zukünftig zu einer Verstärkung des Impfschutzes und/oder zur Reduzierung unerwünschter Nebeneffekte einer Impfung (z.B. Immunsuppression) beitragen zu können.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Expression von Interleukinen und Interferonen durchaus zwischen Junghühnern und adulten Tieren stark variieren kann und somit vom Reifezustand des Immunsystems abhängt. Untersuchungen am Zäkum infizierter Hühnerküken zeigen eine starke Expression von IL-8, einem pro-inflammatorischen Interleukin, das von Makrophagen gebildet wird. Dieser Befund reflektiert die starke Dominanz phagozytierender Zellen des monozytären Systems bei der Salmonellenabwehr. Ebenfalls sind über einen längeren Zeitraum erhöhte Werte für IL-6, einem B-Zell-stimulierenden Interleukin, nachzuweisen, was auf die Induktion einer humoralen Schiene der Salmonellenabwehr hinweist und durch die bereits beschriebene Präsenz von IgA- und IgM-produzierenden Plasma-Zellen im Zäkum infizierter Tiere unterstützt wird. Darüber hinaus kann relativ zeitig eine Expression von IL-2 belegt werden. IL-2 ist ein Induktor/Regulator der T-Zell-Immunantwort und reflektiert die ebenfalls nachgewiesene Zunahme bestimmter T-Effektorzellpopulationen. Neben den Interleukinen zeigt auch Interferon gamma (IFN- γ) eine deutliche Zunahme im Rahmen der frühen *Salmonella*-Infektion (**Abb. 6**).

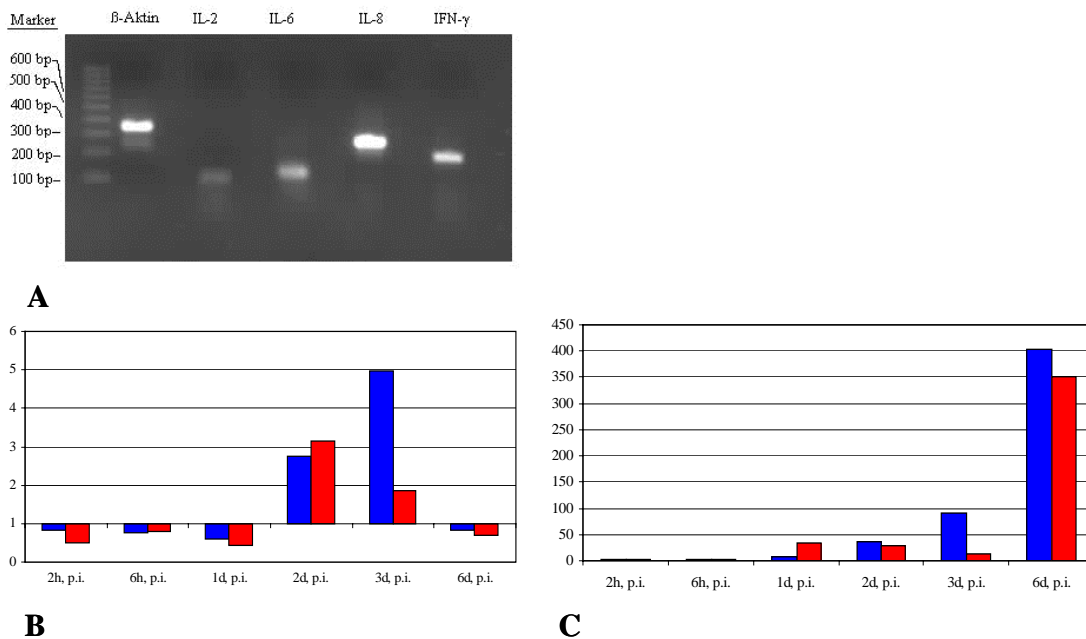


Abb. 6: **A)** Nachweis der mRNA-Expression von Interleukin-2, -6 und -8 sowie IFN- γ im Zäkum eines repräsentativen mit *Salmonella* Enteritidis infizierten Tieres mittels RT-PCR (58 Tage alt, Infektion am 1. und 56. Lebenstag). Quantitative Auswertung der mRNA-Expression für Interleukin-2 (**B**) und Interleukin-8 (**C**) von mit *Salmonella* Enteritidis Wildstamm infizierten (rote Balken) bzw. mit *Salmonella* Enteritidis Lebendimpfstoff immunisierten Eintagsküken (blaue Balken) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung. (Die Werte für die Kontrolltiere wurden auf Eins gesetzt)

[Quelle: B. González Carvajal (2005), Diplomarbeit aus dem Institut für molekulare Pathogenese des FLI (Agr. Immunologie Geflügel), eingereicht über die FSU Jena: „Charakterisierung der Interleukin-mRNA-Expression im Zäkum nach *Salmonella*-Immunisierung und -Infektion von Hühnerküken“]

Für die Produktion von INF- γ kommen Makrophagen und spezielle CD4⁺-T-Zellen in Frage. INF- γ ist für eine adäquate Aktivierung von Makrophagen notwendig und spielt damit insbesondere für die effektive Bekämpfung intrazellulärer Keime eine entscheidende Rolle. Allerdings scheinen IL-6 / IL-8 und INF- γ gegenläufig reguliert zu sein. Vermutlich kommt es bei einer Überexpression von IL-6 / IL-8 zu einer Hemmung der TNF- α - und nachfolgend der INF- γ -Synthese in den verantwortlichen Zellen (Sijben et al., 2003). Das verdeutlicht einerseits die Problematik fakultativ intrazellulär persistierender Erreger für das Immunsystem, andererseits eröffnet es die Möglichkeit einer Effizienzsteigerung von Impfstoffen durch zusätzliche Gabe von Interferonen (Kagaya et al., 1989).

4. Ausblick

Der Verlauf der Immunantwort beim Geflügel nach enteralem Kontakt mit *Salmonella* ist ein komplex reguliertes System und hängt von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren ab: Alter des Tieres bzw. Reifezustand des Immunsystems (insbesondere des GALT), *Salmonella*-Serovar, Art des Antigenkontaktes (Infektion, Immunisierung, Infektion nach Immunisierung), Immunisierungsschema bzw. Hemmphanomene bei Infektion mit gleichen oder unterschiedlichen Serovaren. Die Arbeitsgruppe „Immunologie Geflügel“ des IMP hat sich in intensiver Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Salmonellen“ des IBIZ in mehreren Tierversuchen diesen komplexen Interaktionen gewidmet. Im Zentrum der weiteren Arbeiten stehen Fragen zur Interferenz der B- und T-Zellantwort und zur Funktion von T-Zell-Subpopulationen bei *Salmonella*-Infektionen. Von praktischer Bedeutung sind hier Möglichkeiten zur Intensivierung des Abtötens intrazellulärer Erreger bzw. zur Verstärkung des T-Zell-Memoryeffektes.

5. Literatur

- Berndt, A. und U. Methner.** 2001. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* typhimurium strains. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **78**:143-161.
- Berndt, A. und U. Methner.** 2004. Phenotypic characterization of avian gamma/delta T cells in response to *Salmonella* infection. 7th International Veterinary Immunology Symposium, Quebec City, Canada, July 25th – 30th, 2004.
- Berndt, A. und U. Methner.** 2004. B cell and macrophage response in chickens after oral administration of *Salmonella* Typhimurium strains. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27**:235-246.
- Berndt, A., J. Pieper und U. Methner.** 2005. Gamma/delta T cell response to *Salmonella* exposure in chickens. *Inf. and Immun.*, in revision.
- Chan, M.M., C.-L.H. Chen, L.L. Ager und M.D. Cooper.** 1988. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J. Immunol.* **140**:2133-2138.
- Davison, T.F., T.R. Morris und L.N. Payne.** 1996. Poultry Immunology, Poultry Science Symposium Series Vol. 25, Carfax Publishing Company.
- González Carvajal, B.** 2005. Charakterisierung der Interleukin-mRNA-Expression im Zäkum nach *Salmonella*-Immunisierung und -Infektion von Hühnerküken. Diplomarbeit aus dem Institut für molekulare Pathogenese des FLI (Agr.: Immunologie Geflügel), eingereicht über die FSU Jena.
- Kagaya, K., K. Watanabe und A.Y. Fukazawa.** 1989. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect. Immun.* **57**:609-615.
- Kraehenbuhl, J.P. und A.R. Neutra.** 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:301-332.
- Mastroeni, P. und M. Sheppard.** 2004. Salmonella infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes and Infection* **6**:398-405.
- Mowat, A.M. und J.L. Viney.** 1997. Anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol. Rev.* **156**:145-166.
- Nickel, R., A. Schummer und E. Seiferle:** Lehrbuch der Anatomie der Haustiere; Band V, Anatomie der Vögel, 2. Ed. (Hrsg.: Bernd Vollmerhaus), Parey, 1992.
- Ohl, M.E. und S.I. Miller.** 2001. Salmonella: A model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* **52**:259-274.
- Pastoret, P.-P., P.H. Griebel, H. Bazin und A. Govaerts (eds.).** 1998. Handbook of vertebrate immunology. Academic Press, Toronto.
- Rescigno, M., G. Rotta, B. Valzasina und P. Ricciardi-Castagnoli.** 2001. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* **204**:572-581.
- Sharma, J.M.** 1998. Avian Immunology. In: Pastoret, P.P., Bazin, H., Govaerts, A. und Griebel, P.J. (eds.), Handbook of vertebrate immunology. Academic Press, Toronto.

Sijben, J.W., K.C. Klasing, J.W. Schrama, H.K. Parmentier, J.J. van der Poel, H.F. Savelkoul und P. Kaiser. 2003. Early in vivo cytokine genes expression in chickens after challenge with *Salmonella* typhimurium lipopolysaccharide and modulation by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. Dev. Comp. Immunol. **27**:611-619.

Uzzau, S., D.J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesus, D. J. Platt und J.E. Olsen. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella* enterica. Epidemiol. Infect. **125**:229-255.

Institut für Immunologie:

Die Proteinkonformation bestimmt die Sensitivität infektiöser Hamster-Scrapie-Prionen gegenüber einer Behandlung mit hohem Druck

Pfaff, E.* und Voigt, H.

(in Zusammenarbeit mit Heindl, P., Fernández García, A., Butz, P. und Tauscher, B. [Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Chemie und Biologie, Karlsruhe])

Zusammenfassung

Zur schonenden Pasteurisierung von Lebensmitteln, welche unerwünschte Veränderungen wie Vitaminverlust und Änderungen in Geschmack und Farbe verhindert, kann eine Hochdruckbehandlung angewandt werden. Des Weiteren kann Hochdruck ein geeignetes Verfahren sein, um Strukturänderungen in Proteinen zu untersuchen. Eine Behandlung von Proteinen mit hohem Druck kann Konformationen deutlich machen, die durch andere physikalische Behandlungen wie Temperatur nicht zu erhalten sind. Druck ruft strukturelle Veränderungen hervor, die mit einer Volumenverkleinerung des Moleküls einhergehen. In diesem Artikel werden sowohl die Möglichkeiten des Hochdrucks zur Inaktivierung infektiösen TSE-Materials als auch dessen Anwendung zur Untersuchung der Prion-Protein-Faltung diskutiert. Diese Übersicht fasst die Ergebnisse zusammen, die bei der Anwendung von Hochdruck für die Struktur von nativen infektiösen Prionen in Gehirnhomogenaten infizierter Hamster bzw. für die Struktur von aus dem Gehirn Scrapie-erkrankter Hamster isolierten "prion rods" erhalten wurden. Es konnte dabei gezeigt werden, dass native Prionen drucksensitiv sind, während isolierte Prionen eine Struktur mit hoher Druckresistenz besitzen. Die Diskussion konzentriert sich auf das unterschiedliche Verhalten dieser Prion-Isoformen bei Druckbehandlung und beleuchtet auch die Unterschiede in der jeweiligen Proteinstruktur.

1. Einleitung

Als Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs) werden eine Reihe von tödlichen Erkrankungen bezeichnet, die mit der Anreicherung einer Isoform eines nicht-pathogenen zellulären Proteins (PrP^c) im Gehirn assoziiert sind. Diese Umfaltung des PrP^c zu der pathogenen β -Faltblatt-reichen Isoform (PrP^{Sc}) mit anschließender Selbstvermehrung ist der Hauptschritt einer Prioninfektion, wie Prusiner [1] in seinem "protein only model" als neuen Weg einer Infektion ohne genetische Information postuliert hat. Da im Gegensatz zur bekannten Struktur des zellulären PrP^c [2] die exakte Struktur des infektiösen PrP^{Sc} nicht bekannt ist, konnte auch die Bedeutung der speziellen Konformation für die Vermehrung und Aggregation der Prionen während der Pathogenese bisher nicht definiert werden. Ein Hauptproblem hierbei ist die Unlöslichkeit des PrP^{Sc}. Des Weiteren offenbaren Behandlungen mit Hitze, Ionen, denaturierenden Agenzien und extremen pH-Werten neue konformationelle Strukturen, welche sich von denen des nativen Zustands unterscheiden. Trotzdem konnte man feststellen, dass bei jeder konformationellen Änderung, die zu einer Reduktion der Infektiosität führt, die Inaktivierung irreversibel ist [3,4].

Die Erreger, welche eine Prionerkrankung auslösen, sind relativ resistent gegenüber einer Vielzahl von konventionellen Inaktivierungsprozessen [5-7]. Aus diesem Grund ist es notwendig, TSE-Risikomaterial mit anderen Methoden zu inaktivieren. Solche Methoden sind unter anderem eine Behandlung mit 1 M Natronlauge für eine Stunde bei Raumtemperatur oder verschiedene Sterilisationsmethoden mittels Autoklaven bei 132-138 °C für 18 – 60 Minuten. Es konnte gezeigt werden, dass hierbei keine vollständige Inaktivierung des TSE-Agens erfolgte [8]. Es existieren aber alternative mildere Prozesse zur Inaktivierung von Pathogenen. Eine solche milde Methode, welche schon Erfolg versprechend bei der Pasteurisierung und Sterilisation von Lebensmitteln angewandt wird, ist hoher hydrostatischer Druck [9,10]. Sollte es sich zeigen, dass eine effektive Inaktivierung der TSE-Agenzien mittels hohen Druckes möglich ist, könnte die Sicherheit von Produkten und Lebensmitteln tierischen Ursprungs sowie von tierischen Futtermitteln, Kosmetika und Arzneimitteln deutlich erhöht werden, ohne dass die Qualität der behandelten Produkte leidet.

Ein weiterer Aspekt bei der Behandlung von Prionen mit hohem Druck ist die Möglichkeit, Informationen über die Konformation des Proteins zu erhalten, da Druck ein thermodynamischer Parameter ist [11,12]. Hoher hydrostatischer Druck verschiebt chemische Gleichgewichte und beschleunigt Prozesse, wenn das Volumen des Übergangszustandes kleiner ist als dasjenige des Basiszustandes. Deshalb können unter Druck neben Temperatur und chemischer Denaturierung auch unerwartete Effekte beobachtet werden, was zur Möglichkeit der Beobachtung von Zwischenstufen der Proteinfaltung führt [13].

So könnte hoher Druck bestimmte Faltungszwischenstufen stabilisieren [14] oder die Menge an normalen und fehlgefalteten Zwischenstufen erhöhen, die für die amyloiden Strukturen zur Verfügung gestellt werden [15]. Aus diesem Grund ergibt die Anwendung von Hochdruck neue Erkenntnisse über die Struktur der Amyloide und kann möglicherweise zur Entwicklung von Leitpharmazeutika beitragen.

Unser Beitrag zum gegenwärtigen Kenntnisstand über Druckeffekte bei Prion-Proteinen umfasst phänomenologische Studien unter Verwendung der Proteinase K (PK)-Resistenz von infektiösem PrP^{Sc}, aminoterminal verkürztem und PK-resistentem PrP^{Sc} (PrP27-30). Des Weiteren wurden die durch Immunoblot erhaltenen Resultate nach Hochdruckbehandlung immer mit der verbleibenden Infektiosität mittels Infektionsversuchen an Versuchstieren verglichen, um die effiziente Inaktivierung zu bestimmen und möglicherweise Unterschiede zwischen der Proteinkonformation und der Inaktivierungsrate zu erkennen. Die kombinierte Druck-/Temperaturbehandlung der Proben, die bei diesen Experimenten angewandt wurde, erfolgte immer unter den bekannten Bedingungen zur Denaturierung von PrP^{Sc}. Die bei 60 °C und neutralem pH durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Drücke von ≥ 500 MPa eine signifikante Verringerung der PK-Resistenz und Infektiosität der Prionen ergab, was auf eine Strukturänderung innerhalb dieser Prionen zurückgeführt werden kann [16]. Allerdings zeigen Differenzen bei anderen physikalisch-chemischen Bedingungen [17] und zwischen isolierten und "nativen" Prionen [18], dass Druckeffekte stark von der Prionkonformation abhängen und dass Prionfraktionen existieren, welche speziell Hochdruck-resistent sind.

2. Druckeffekte bei infektiösen Prion-Proteinen

Die PK-Resistenz des Hamster-Scrapie-Stamms 263K wurde untersucht. Hirnhomogenate, welche das "full length" PrP^{Sc} (natives PrP^{Sc}) oder das N-terminal verkürzte PrP^{Sc} (PrP27-30) enthielten, wurden unter verschiedene Temperatur- und Druckbedingungen gesetzt. Das Gehirngewebe wurde hierzu auch in verschiedenen Puffern oder in Wasser homogenisiert. Des Weiteren wurden infektiöse Prionen aus dem Gehirn terminal erkrankter Hamster isoliert und die erhaltenen Prionfibrillen (iPrP27-30) nach Resuspendierung in verschiedenen Puffern ebenfalls einer Druckbehandlung unterzogen. Die nach der Druckbehandlung erhaltenen Proben wurden dann in Immunoblots auf ihre PK-Resistenz bzw. in Hamster-Bioassays auf ihre Infektiosität untersucht.

2.1 Druck/Temperatur-Effekte bei nativem infektiösem Prionprotein

In einer Reihe von Experimenten wurden native infektiöse Prion-Proteine Drücken von 100 MPa bis 1.000 MPa bei einer Temperatur von 60 °C ausgesetzt. Dabei konnte gezeigt werden [16], dass eine Druckbehandlung Einfluss auf die PK-Resistenz des infektiösen Prion-Proteins hat. Eine Behandlung mit Drücken von ≥ 500 MPa führte in Immunoblots zum vollständigen Verschwinden der PK-Resistenz (Abb.1, Spur 2). Eine Druckbehandlung ist allerdings nur in Verbindung mit Temperaturen von ≥ 60 °C in der Lage, die PK-Resistenz und Infektiosität des nativen infektiösen Prion-Proteins zu vermindern. Versuche bei Raumtemperatur zeigten keinen Effekt auf die Infektiosität. Wegen der geringeren Sensitivität des Immunoblots [19,20] wurden auch Bioassays in Hamstern durchgeführt. Diese zeigten eine Reduktion um 6 -7 log ID₅₀-Einheiten pro g Gehirnmateriale, wenn die Probe in PBS pH 7,4 mit 800 MPa bei 60 °C für 120 min behandelt wurde. Hier zeigte sich, dass diese Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Infektiosität führte, wenn hoher Druck mit milden Temperaturen kombiniert wurde (Tabelle 1).

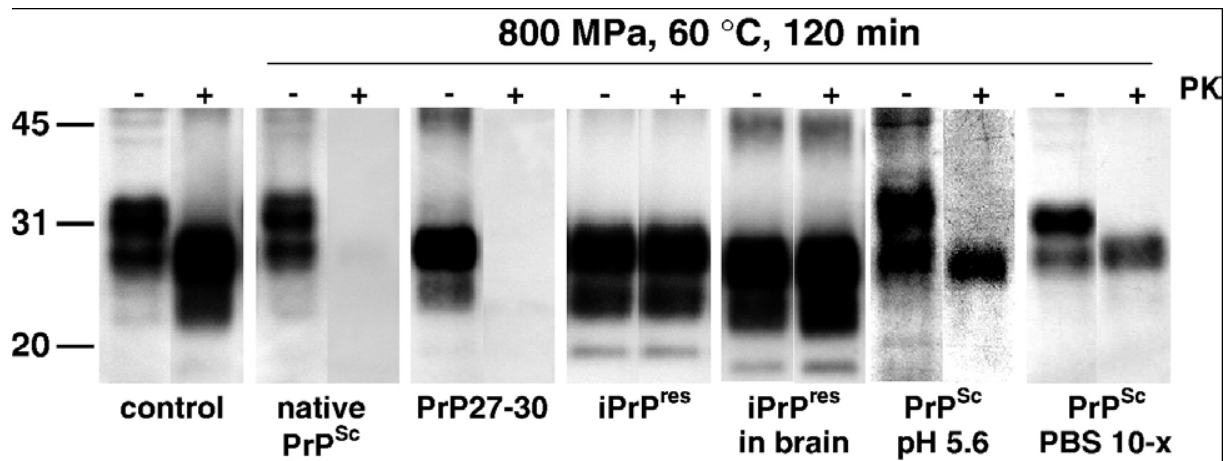


Abb. 1 Druckeffekte auf die Proteinase K-Resistenz infektiöser Prion-Proteine. Immunoblots mit PrP^{Sc} und PrP 27-30 in Gehirnhomogenaten Scrapie-infizierter Hamster und mit isolierten “prion rods“ mit dem 3F4-Antikörper. Natives PrP^{Sc} und PrP 27-30 wurden in PBS, pH 7,4 druckbehandelt. PrP^{Sc} wurde auch in PBS, pH 5,6 und in 10fach konzentriertem PBS druckbehandelt. Isolierte “prion rods“ wurden in PBS, pH 7,4 oder Gehirnhomogenat (in PBS, pH 7,4) von gesunden Hamstern resuspendiert und druckbehandelt. Die Reaktionsbedingungen waren 800 MPa, 60 °C und 120 min. Nach der Druckbehandlung wurden die Proben geteilt und ein Teil mit PK (+) behandelt. Die Kontrollproben wurden nur bei 60 °C für 120 min behandelt.

Tabelle 1: Proteinase K-Resistenz, Inkubationszeiten und Infektiositätstiter druckbehandelter infektiöser nativer Hamster-Scrapie-Prionen

Proben	PK-Resistenz	Inkubationszeit	Infektiosität
		(in Tagen)	Log ID ₅₀ (u/g)
unbehandelte Kontrolle	resistent	82 ± 8	8,6 ± 0,4
60 °C, 30 min	resistent	85 ± 5	7,7 ± 0,6
60 °C, 120 min	resistent	90 ± 6	7,3
800 MPa, 60 °C, 1 sec	sensitiv	115 ± 5	5,1 ± 0,5
800 MPa, 60 °C, 30 min	sensitiv	134 ± 17	3,4 ± 0,7
800 MPa, 60 °C, 120 min	sensitiv	170 ± 38	2,1 ± 0,2
800 MPa, 80 °C, 30 min	sensitiv	194 ± 38	1,0 ± 0,2

Die Proteinase K-Resistenz wurde mittels Immunoblots nach Behandlung mit PK (73 µg/ml Endkonzentration) für eine Stunde bei 37 °C ermittelt. Die Ergebnisse der Bioassays zeigen die mittlere Inkubationszeit (Tage±/ - S.D.) der Tiere nach Inokulation von 1,5 mg Scrapie-infiziertem Gehirnhomogenat nach Erhitzen und/oder Druckbehandlung bei 60 °C bzw. 80 °C für verschiedene Zeitwerte. Der Infektiositätstiter (in log ID₅₀ Einheiten pro g Gehirngewebe) wurde mittels des Inkubationszeit-Intervall-Tests von Prusiner [36] bestimmt.

Der Grund für das untypische Verhalten des infektiösen Prion-Proteins wird dem im Gegensatz zum zellulären Prion-Protein hohen Gehalt von β -Faltblatt-Strukturen in der Sekundärstruktur des Proteins zugeschrieben. Dies führt möglicherweise auch zu der hohen Resistenz von PrP^{Sc} gegen proteolytischen Abbau und der hohen Neigung zur Bildung aggregierter Amyloid-ähnlicher Plaques. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Verlust an Infektiosität der Prionen mit der Abnahme an β -Faltblatt-spezifischen Strukturen unter gleichzeitiger Bildung α -helikaler Strukturen einhergeht [4]. Ähnliche Effekte konnten auch von Riesner et al. gezeigt werden, indem mittels SDS-Behandlung die "prion rods" zerstört wurden und Partikel mit α -helikalen Strukturen entstanden, welche ihre Infektiosität verloren hatten [21].

Eine plausible Erklärung für den Verlust an Infektiosität und PK-Resistenz der hochdruckbehandelten Proben könnte ein Effekt des Drucks auf die Sekundärstruktur des nativen PrP^{Sc}-Moleküls sein.

2.2 Druck-/Temperatur-Effekte bei N-terminal verkürztem PrP^{Sc} (PrP 27-30)

Das N-terminal verkürzte PrP^{Sc} (PrP 27-30) zeigt eine vergleichbare Drucksensitivität im homogenisierten Hamster-Gehirn (in PBS, pH7,4). Nach Druckbehandlung bei 800 MPa und 60 °C für 120 min konnte im Immunoblot keine PK-resistente Bande identifiziert werden. Ohne PK-Behandlung konnte dagegen ein klares Signal des PrP 27-30 erhalten werden. Dies demonstriert, dass eine vorherige PK-Behandlung die Druckeigenschaften von PrP^{Sc} nicht verändert hat (Abb. 1, Spur 3).

2.3 Druck-/Temperatur-Effekte bei isolierten infektiösen Prionen

Im Gegensatz zu den oben angeführten Resultaten sind isolierte und resuspendierte Prionen (iPrP 27-30) nach Druckbehandlung mit 800 MPa bei 60 °C in verschiedenen Puffern (PBS, pH 7,4; Tris/HCl, pH 7,0) und in Wasser nicht PK-sensitiv [19]. Es scheint, dass durch eine kombinierte Druck-/ Temperaturbehandlung isolierter Prionen unter nicht-denaturierenden Temperaturbedingungen die β -Faltblatt-Strukturen nicht destabilisiert werden und deshalb die PK-Resistenz erhalten bleibt (Abb.1, Spur 4). Auch unter den oben angewandten Bedingungen druckbehandelte isolierte Prionen, die in Gehirnhomogenat von nicht Scrapie-infizierten Hamstern resuspendiert wurden, zeigten keine PK-Sensitivität (Abb. 1, Spur 5). Das zeigt, dass keine zusätzlichen Faktoren aus dem Gehirn für den gefundenen Druckeffekt verantwortlich sind, sondern sehr wahrscheinlich ausschließlich die Konformation des Prion-Proteins für das Verhalten unter Hochdruck eine Rolle spielt.

Weitere Studien an isolierten Prionen zeigten, dass die Ultrazentrifugation bei 540.000 x g bei der Reinigung eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Druckresistenz spielt. Es ist bekannt, dass bei Ultrazentrifugationen von 540.000 x g hydrophobe Proteine wie das Prion-Protein zu hoch aggregierten hydrophoben Agglomeraten führen, in welchen die Proteine nicht mehr hydratisiert sind. In diesen Fällen erscheint es möglich, dass die Reinigung von PrP 27-30 eine semi-kristalline Struktur ausbildet, welche deutlich Druck-resistenter ist als die Struktur von nativem PrP^{Sc}. Berücksichtigt man, dass Hohlräume in Proteinen eine wichtige Rolle bei der Protein-Denaturierung spielen [22], so zeigen die Proteinstrukturen nach der Reinigungsprozedur geringere Hohlräume als die nativen hydratisierten Strukturen und sind deshalb wesentlich stabiler gegenüber Druckbehandlung. Dies konnte bei Amyloidfibrillen, die vom Transthyretin 105 - 110-Peptid gebildet werden, gezeigt werden [23]. Neu gebildete Fibrillen dieses Peptids sind drucksensitiv, während reife Fibrillen druckresistent sind. Es scheint, dass PrP^{Sc} sehr früh während der Reinigungsprozedur eine Struktur annimmt, die sich von der des nativen PrP^{Sc} unterscheidet. Dies kann auf Basis der bekannten Druckresistenz bestimmter Proteinkonformationen überprüft werden. Die gereinigten Prionen sind nach wie vor infektiös, unterscheiden sich jedoch von der nativen Form. Dies bedeutet aber auch, dass die bekannten Prion-Strukturmodelle, welche alle auf der Analyse von gereinigtem iPrP 27-30 [24,25] beruhen, und spektroskopische Analysen infektiöser Prionen, die durch Ultrazentrifugation erhalten wurden [26,27], verfälscht sein können, weil sie nicht die reale Struktur nativer Prionen darstellen können.

2.4 pH- und Ioneneffekte auf die Drucksensitivität nativer Prionen

Die Dissoziation verschiedener Puffer wie PBS und Wasser ist unter hohem Druck beschleunigt, weil die Gleichgewichtskonstanten druckabhängig sind. Deshalb ist eine Veränderung zu einem saureren pH-Wert bei Wasser und PBS unter Druck zu beobachten [28]. Allerdings gibt es Hinweise, dass Druckeffekte auf das Prionmolekül sofort bei Druckaufbau zu sehen sind, da sowohl in PBS als auch in Wasser oder TRIS-Puffer, pH 7,0, von dem bekannt ist, dass er druckstabil ist, dasselbe Inaktivierungsmuster zu sehen ist. Es scheint, dass ein initialer neutraler pH-Wert zur Druckinaktivierung von nativem Prion-Protein notwendig ist, da in allen Fällen, wo der pH-Wert unter 6,5 lag, keine Inaktivierung möglich war (Abb.1 Spur 6 und [18]). Prionen aggregieren unter sauren Bedingungen [29,30], was zu einer Änderung ihrer Proteinstruktur führt. Diese kann durch Druckbehandlung nicht mehr umgedreht werden. Einige Autoren berichten, dass Prionaggregation unter sauren Bedingungen zu einem vermehrten Anteil an β -Faltblatt-Strukturen führt [31], was auch die im Vergleich zu neutralem pH-Wert erheblich erhöhte Druckstabilität erklärt.

Weitere Studien mit verschiedenen konzentrierten PBS-Puffern zeigen einen bemerkenswerten Einfluss der Salzkonzentration auf die Drucksensitivität nativer Prionen. Ähnlich den Effekten, die bei saurem pH-Wert gefunden wurden, scheint die Struktur des infektiösen nativen Prion-Proteins in 10fach konzentriertem PBS stabilisiert zu werden, da eine erhebliche Fraktion PK-resistenten Prion-Proteins im Immunoblot nachweisbar ist (Abb. 1, Spur 7 und [17]). Es ist bekannt, dass die Ionenkonzentration die Löslichkeit von Proteinen erheblich beeinflusst und außerdem elektrostatische Wechselwirkungen intramolekulare β -Faltblatt-Strukturen stabilisieren [32]. Folglich ist die Stabilisierung der Prionstruktur in Puffern mit hoher Ionenstärke möglicherweise auf lokale Effekte bei geladenen Aminosäuren zurückzuführen, was zu einer Stabilisierung elektrostatischer Wechselwirkung und dadurch zu einer Stabilisierung des Prionmoleküls gegenüber Druckbehandlung führt.

3. Effekte von kombinierter Druck-/Temperaturbehandlung auf die Infektiosität von Prionen

Bis jetzt wurden vor allem Daten über Druckeffekte auf nicht infektiöses rekombinantes Prion-Protein publiziert [33]. In letzter Zeit sind nun auch Daten erschienen, in denen gezeigt wurde, dass Druckbehandlung nützlich sein kann, um neue Proteinkonformationen zu erhalten. Keine dieser Formen, die nach Druckbehandlung rekombinanter zellulärer Prion-Proteine erhalten wurden, war jedoch infektiös. Ein erster Versuch zu verstehen, wie hoher Druck auf infektiöse Prion-Proteine wirkt, wurde durch eine Inaktivierung von Prion-Proteinen mittels einer Hochdruck-unterstützten Sterilisation untersucht [34]. Hierbei steigt die Temperatur innerhalb weniger Sekunden auf 135 – 142 °C und die Autoren erhalten Inaktivierungsraten ähnlich denen durch Autoklavieren.

Unsere Studien zeigen einen klaren Effekt des Hochdrucks auf die Infektiosität infektiöser Prionen. Wiederholte Bioassays zur Untersuchung von Proben, welche bei Temperaturen (60 – 80 °C), die weit unter den typischerweise für die thermische Inaktivierung angewandten liegen, zeigten eine deutliche Verminderung der Infektiosität von bis zu 7 logs ID₅₀ u/g bei einem Druck von 800 MPa und zwei Stunden Reaktionszeit. Eine 30 min Reaktion unter denselben Bedingungen vermindert die Infektiosität um 5 log-Stufen (Tabelle 1). Die Inaktivierungsrate bei 800 MPa und 60 °C für 120 min ist vergleichbar mit der empfohlenen Prozedur, z.B. Autoklavierung bei 134 °C für 18 min [35].

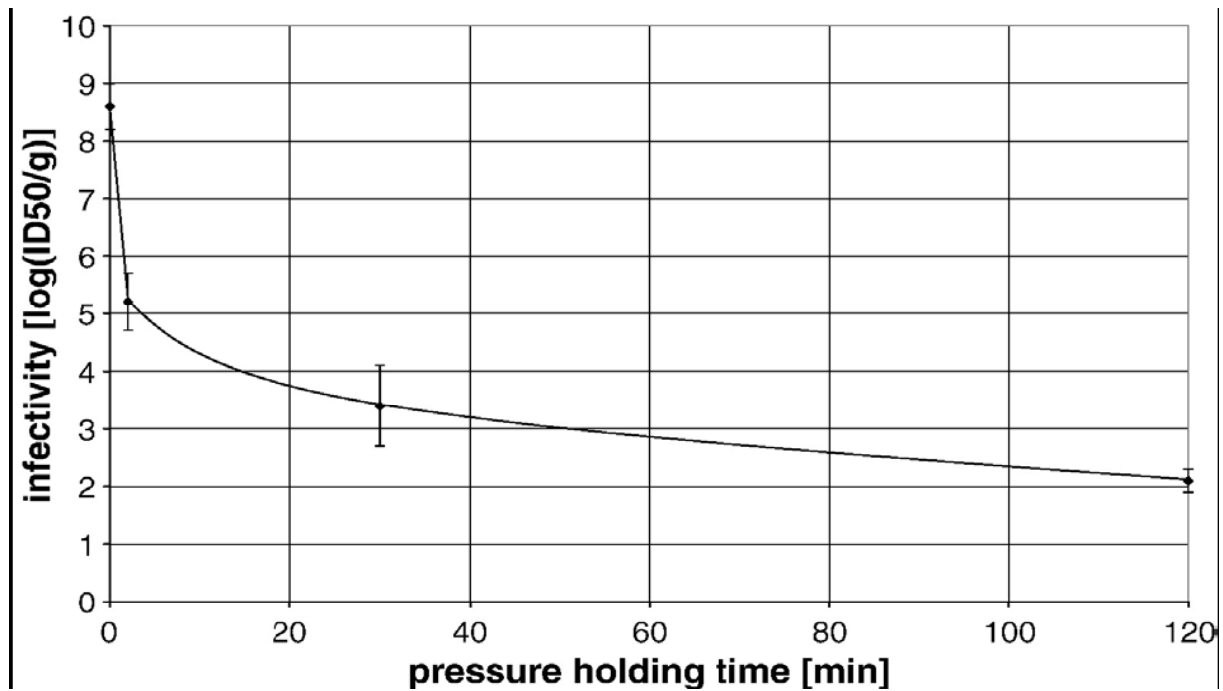


Abb. 2: Inaktivierungskurve des Hamster-Scrapiestamms 263 K während der Druckbehandlung bei 800 MPa und 60 °C.

4. Schlussbetrachtung

Der pathologische Prion-Protein Stamm 263 K in seiner nativen Form ist bei anfänglich neutralen Bedingungen hoch sensitiv für eine Hochdruckbehandlung. Wir konnten in Experimenten zeigen, dass Druck kombiniert mit Temperaturen, die weit unter den bekannten Denaturierungstemperaturen liegen, Änderungen in der Proteinstruktur induziert. Dies führt zum Verlust der PK-Resistenz. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei der Druckbehandlung von N-terminal verkürztem Prion-Protein, PrP 27-30, in Gehirnhomogenaten erhalten werden. Auch dieses Prion-Protein zeigte nach Druckbehandlung einen Verlust der PK-Resistenz. Im Gegensatz dazu zeigte isoliertes iPrP 27-30 eine außerordentlich hohe Stabilität bei einer Druckbehandlung, weil Druck nicht in der Lage war, Änderungen in der Proteinstruktur der Prionen nach einer Ultrazentrifugation bei 540.000 x g zu induzieren. Somit blieb die PK-Resistenz erhalten. Desgleichen zeigte das native PrP^{Sc} eine vergleichbare Stabilität bei Druckbehandlung, wenn dieses in Puffern mit saurem pH oder hoher Ionenkonzentration druckbehandelt wurde.

Generell zeigen unsere Ergebnisse, dass die Mehrzahl der Prionen bei nahezu nativen Bedingungen drucksensitiv ist und ihre Infektiosität sehr schnell nach Druckaufbau verliert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung, die zu stärker aggregierten und/oder dehydratisierten Strukturen führt, eine stärkere Resistenz gegenüber Druckbehandlung bedingt. Deshalb scheint die Inaktivierung von infektiösen Prionen stark von der Proteinkonformation abhängig zu sein. Als Ergebnis können wir von diesen Versuchen ableiten, dass eine bestimmte Konformation drucksensitive β -Faltblatt-Strukturen (native Prionen), eine andere aber druckstabile β -Faltblatt-Strukturen (stärker aggregierte Prionen, die weniger hydratisiert sind und geringere Hohlräume besitzen) besitzt. Beide Formen können auch koexistieren. Die Stabilisierung der nativen Strukturen durch die Bildung verschieden geordneter β -Faltblatt-Strukturen wäre damit entscheidend für die Druckstabilität der infektiösen Prionen. Dies deutet darauf hin, dass die extrem druckstabilen Prionaggregate nicht durch ihre Quartärstruktur, die gewöhnlich sensitiv gegenüber einer Druckbehandlung ist, stabilisiert werden, sondern durch neu geordnete β -Faltblatt-Strukturen mit geringeren Hohlräumen. Diese Schlussfolgerung basiert auf den Erkenntnissen der "protein only" Theorie und den akzeptierten Konzepten über das Verhalten von Proteinen unter Druck.

Die Resultate zeigen, dass Druck (über 800 MPa) kombiniert mit mittleren Temperaturen (nicht über 60 °C) ausreicht, um eine irreversible und akzeptable Inaktivierung von infektiösen Prionen zu gewährleisten. Durch Optimierung der Druckbedingungen kann eine schonende Inaktivierung von kontaminiertem Material mit dieser Technologie durchgeführt werden. Des Weiteren könnten Kombinationen von Druck und anderen denaturierenden Reagenzien neue Einsichten in das Verhalten der Prionen gewähren, um mittels neuer Parameter die realen Auswirkungen des Drucks auf die Prion-Protein-Struktur zu untersuchen.

Danksagung

Dieses Projekt wurde durch das TSE-Programm des Landes Baden-Württemberg unterstützt.

Literatur

- [1] **Prusiner, S.B.** 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136-144.
- [2] **Weissmann, C.** 2004. The state of the prion. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:861-871.
- [3] **Riesner, D.** 2002. Molecular basis of prion diseases. *J. Neurovirol.* **8**:8-20.
- [4] **Safar, J., P.P. Roller, D.C. Gajdusek und C.J. Jr. Gibbs.** 1993. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci.* **2**:2206-2216.
- [5] **Brown, P., R.G. Rohwer und D.C. Gajdusek.** 1986. Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeld-Jakob-Disease virus in brain tissue. *J. Infect. Dis.* **153**:1145-1148.
- [6] **Taylor, D.M., H. Fraser, I. McConnell, D.A. Brown, K.L. Brown, K.A. Lamza und G.R.A. Smith.** 1994. Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch. Virol.* **139**:313-326.
- [7] **Taylor, D.M.** 2000. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet. J.* **159**:10-17.
- [8] **Taylor, D.M.** 1999. Inactivation of prions by physical and chemical means. *J. Hosp. Infect.* **43**:569-576.
- [9] **San Martin, M.F., G.V. Barbosa-Canovas und B.G. Swanson.** 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42**:627-645.
- [10] **Fernandez Garcia, A., P. Butz und B. Tauscher.** 2001. Effects of high-pressure processing on carotenoid extractability, antioxidant activity, glucose diffusion, and water binding of tomato puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *J. Food Sci.* **66**:1033-1038.
- [11] **Winter, R. und W. Dzwolak.** 2005. Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins. *Philos. Transact. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **363**:537-562.
- [12] **Heremans, K. und L. Smeller.** 1998. Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochim. Biophys. Acta* **1386**:353-370.
- [13] **Royer, C.A.** 2002. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **1595**:201-209.
- [14] **Foguel, D. und J.L. Silva.** 2004. New insights into mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. *Biochemistry* **43**:11361-11370.
- [15] **Torrent, J., M.T. Alvarez-Martinez, M.C. Harricane, F. Heitz, J.P. Liautard, C. Balny und R. Lange.** 2004. High pressure induces scrapie-like prion protein misfolding and amyloid fibril formation. *Biochemistry* **43**:7162-7170.
- [16] **Fernandez Garcia, A., P. Heindl, H. Voigt, M. Büttner, D. Wienhold, P. Butz, J. Stärke, B. Tauscher und E. Pfaff.** 2004. Reduced proteinase K resistance and infectivity of prions after pressure treatment at 60 °C. *J. Gen. Virol.* **85**:261-264.
- [17] **Heindl, P., A. Fernandez Garcia, M. Büttner, H. Voigt, P. Butz, B. Tauscher und E. Pfaff.** 2005. Some physico-chemical parameters that influence proteinase K resistance and the infectivity of Pr^{DSc} after high pressure treatment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**:1223-1231.
- [18] **Garcia, A.F., P. Heindl, H. Voigt, M. Büttner, P. Butz, N. Tauber, B. Tauscher und E. Pfaff.** 2005. Dual nature of the infectious prion protein revealed by high pressure. *J. Biol. Chem.* **280**:9842-9847.
- [19] **Wadsworth, J.D., S. Joiner, A.F. Hill, T.A. Campbell, M. Desbruslais, P.J. Luthert und J. Collinge.** 2001. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeld-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**:171-180.
- [20] **Schmerr, M.J., K.R. Goodwin und R.C. Culp.** 1994. Capillary electrophoresis of the scrapie prion protein from sheep brain. *J. Chromatogr. A* **680**:447-453.
- [21] **Riesner, D., K. Kellings, K. Post, H. Wille, H. Serban, D. Groth, M.A. Baldwin und S.B. Prusiner.** 1996. Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high α -helical content and lacking scrapie infectivity. *J. Virol.* **70**:1714-1722.
- [22] **Heremans, K.** 2005. Protein dynamics; hydration and cavities. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**:1157-1165.
- [23] **Dirix, C., F. Meersman, C.E. MacPhee, C.M. Dobson und K. Heremans.** 2005. High hydrostatic pressure dissociates early aggregates of TTR105-115, but not the mature amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **347**:903-909.

- [24] **Wille, H., M.D. Michelitsch, V. Guenebaut, S. Supattapone, A. Serban, F.E. Cohen, D.A. Agard und S.B. Prusiner.** 2002. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:3563-3568.
- [25] **Huang, Z., S.B. Prusiner und F.E. Cohen.** 1996. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold. Des.* **1**:13-19.
- [26] **Safar, J., P.R. Roller, D.C. Gajdusek und C.J. Jr. Gibbs.** 1993. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J. Biol. Chem.* **268**:20276-20284.
- [27] **Pan, K.-M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen und S.B. Prusiner.** 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:10962-10966.
- [28] **Funtenberger, S., E. Dumay und J.C. Cheftel.** 1995. Pressure-induced aggregation of β -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **28**:410-418.
- [29] **Prusiner, S.B., D.F. Groth, M.P. McKinley, S.P. Cochran, K.A. Bowman und K.C. Kasper.** 1981. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**:4606-4610.
- [30] **Cai, K., J.L. Miller, C.J. Stenland, K.J. Gilligan, R.C. Hartwell und D.C. Terry.** 2002. Solvent-dependent precipitation of prion protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1597**:28-35.
- [31] **Selvaggini, C., L. De Gioia, L. Cantu, E. Ghibaudi, L. Diomede, F. Passerini, G. Forloni, O. Bugiani, F. Tagliavini und M. Salmona.** 1993. Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**:1380-1386.
- [32] **Goossens, K., J. Haelewyn, F. Meersmann, M. De Ley und K. Heremans.** 2003. Pressure- and temperature-induced unfolding and aggregation of recombinant human interferon- γ : a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochem. J.* **370**:529-535.
- [33] **Cordeiro, Y., J. Kraineva, R. Winter und J.L. Silva.** 2005. Volume and energy folding landscape of prion protein revealed by pressure. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**:1195-1201.
- [34] **Brown, P., R. Meyer, F. Cardone und M. Pocchiari.** 2003. Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: a practical method to prevent human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:6093-6097.
- [35] **Taylor, D.M., K. Fernie, I. McConnell und P.J. Steele.** 1998. Observations on thermostable subpopulations of the unconventional agents that cause transmissible degenerative encephalopathies. *Vet. Microbiol.* **64**:33-38.
- [36] **Prusiner, S.B., S.P. Cochran, D.F. Groth, D.E. Downey, K.A. Bowman und H.M. Martinez.** 1982. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.* **11**:353-358.

Institut für Epidemiologie:

Zur BSE-Situation bei in Deutschland geborenen Rindern fünf Jahre nach Einführung des totalen Verfütterungsverbot

Selhorst, T., Pottgießer, C., Teske, K., Kämer, D., Mettenleiter, T.C., Groschup, M.H. und Conraths, F.J.*

Einleitung

In Deutschland und anderen Mitgliedstaaten der Europäischen Union beruht die Bekämpfung der BSE-Infektion von Rindern auf dem Verbot der Verfütterung von tierischem Eiweiß an Wiederkäuer und ab 2001 zusätzlich auf dem Verbot der Verfütterung von tierischen Fetten aus BSE-Risikoorganen.

Da es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass BSE horizontal (von Rind zu Rind) übertragen wird und der vertikalen Übertragung (von der Kuh auf das Kalb), die wahrscheinlich grundsätzlich möglich ist, keine epidemiologische Bedeutung zukommt, sollte die Einführung des totalen Fütterungsverbot dazu führen, dass BSE mit dem Ausscheiden von BSE-infizierten Tieren aus der Population ebenfalls eliminiert wird.

In Deutschland geborene Rinder, bei denen BSE festgestellt wird, sind im Mittel 5,4 Jahre alt. Da das totale Verfütterungsverbot Anfang 2001 in Kraft getreten ist, ergibt sich jetzt, im Jahre 2006, also nach mehr als fünf Jahren, ein günstiger Zeitpunkt, die BSE-Situation in Deutschland neu zu bewerten. Aus dem zahlenmäßigen und zeitlichen Auftreten von BSE-erkrankten Rindern, die nach dem Verfütterungsverbot geboren waren, kann nun erstmals die Wirksamkeit dieses Verbots abgeschätzt werden. Im günstigsten Fall kann damit erstmals eine Prognose zur Zahl der in den nächsten Jahren zu erwartenden BSE-Fälle gegeben werden.

Des Weiteren liegen für bestimmte Bundesländer Ergebnisse epidemiologischer Untersuchungen vor, die potenzielle Risikofaktoren für das Auftreten von BSE identifizierten.

Zeitliche Entwicklung des BSE-Geschehens in Deutschland

Betrachtet man die BSE-Inzidenzen auf Jahresbasis (Abb. 1), so findet man trotz eines leichten Anstiegs der Inzidenz im Jahre 2004 einen abnehmenden linearen Trend für den gesamten Zeitraum von 2001 bis 2005. Dieser abnehmende Trend ist statistisch signifikant. Die Inzidenz für das Jahr 2000 muss dabei außer Acht gelassen werden, da erst ab November 2000 mit der aktiven BSE-Surveillance begonnen wurde.

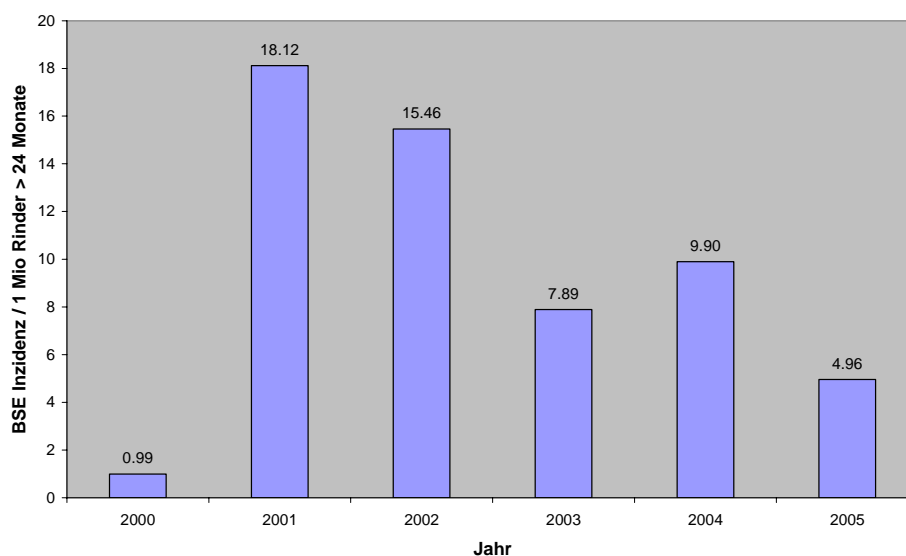


Abb. 1: Inzidenz von BSE bei in Deutschland geborenen Rindern in den Jahren 2000 bis 2005

Zeitliche Entwicklung des Alters der Rinder, bei denen BSE festgestellt wurde

Das Alter der Tiere, bei denen BSE festgestellt wurde, lag im Jahr 2001 im Mittel bei 64,19 Monaten und in den folgenden Jahren im Mittel bei 73,11 Monaten (Abb. 2). Der Unterschied von ca. neun Monaten im Alter der Tiere bei der BSE-Feststellung zwischen dem Jahr 2001 und den folgenden Jahren ist statistisch signifikant.

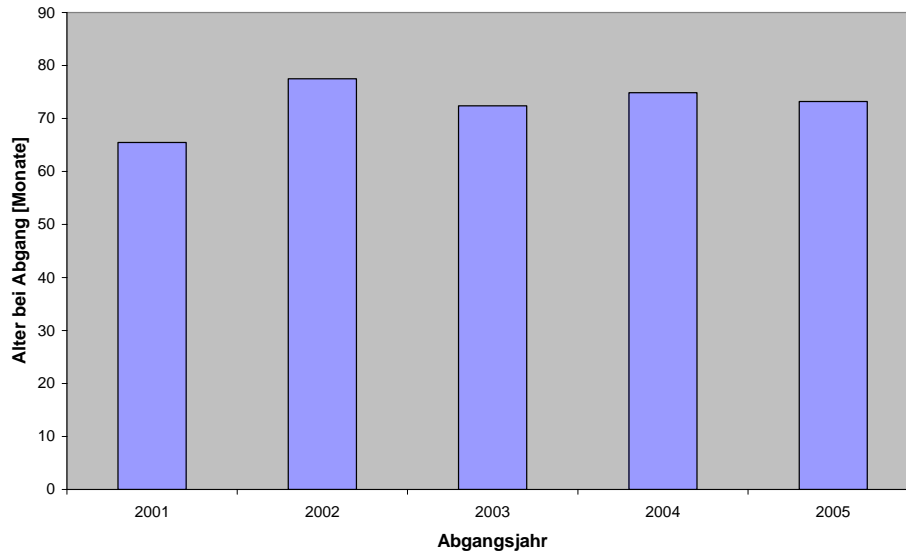


Abb. 2: Alter in Monaten von in Deutschland geborenen Rindern bei der Feststellung von BSE in den Jahren 2001 bis 2005

Häufigkeitsverteilung des Alters bei Feststellung

Vergleicht man die Häufigkeitsverteilung des Alters der Rinder, bei denen BSE festgestellt wurde, mit der Altersverteilung von Rindern (> 24 Monate) aus einer Vergleichsgruppe, die zufällig aus der Gesamtpopulation der Rinder gezogen wurde, wird insbesondere in den unteren Altersklassen, das heißt bei den jüngeren Tieren, ein Unterschied in der Verteilung deutlich (Abb. 3; Abb. 4). Die Daten zu der Vergleichsgruppe von Rindern entstammen einer Abfrage des Herkunft- und Identifikationssystems Tier (HI-T). Die Vergleichsgruppe besteht aus einer Stichprobe von Tieren, die zum Zeitpunkt des Abgangs älter als 24 Monate waren und im Jahr 2005 aus der Population ausgeschieden sind (d.h. starben, getötet oder geschlachtet wurden). Es ist nicht bekannt, ob Tiere, bei denen im Jahre 2005 BSE festgestellt wurde, in dieser Stichprobe enthalten sind. Wären zufällig alle BSE-Tiere in der Stichprobe enthalten, so würde ihr Anteil an der Gesamtstichprobe nur ca. 0,2% betragen. Somit könnten BSE-Tiere, falls sie zufällig in die Stichprobe der Vergleichsgruppe gelangt sein sollten, das Ergebnis der Analyse kaum beeinflussen.

Das Alter von zwei in Deutschland geborenen Rindern, bei denen BSE festgestellt wurde, lag unter 30 Monaten. Diese beiden Fälle wurden zu Beginn des Jahres 2001 diagnostiziert. Seitdem ist BSE in Deutschland nicht mehr bei Rindern festgestellt worden, die jünger als 30 Monate waren. Die Altersverteilung der Rinder, bei denen BSE amtlich festgestellt wurde, ist in Abbildung 3 dargestellt.

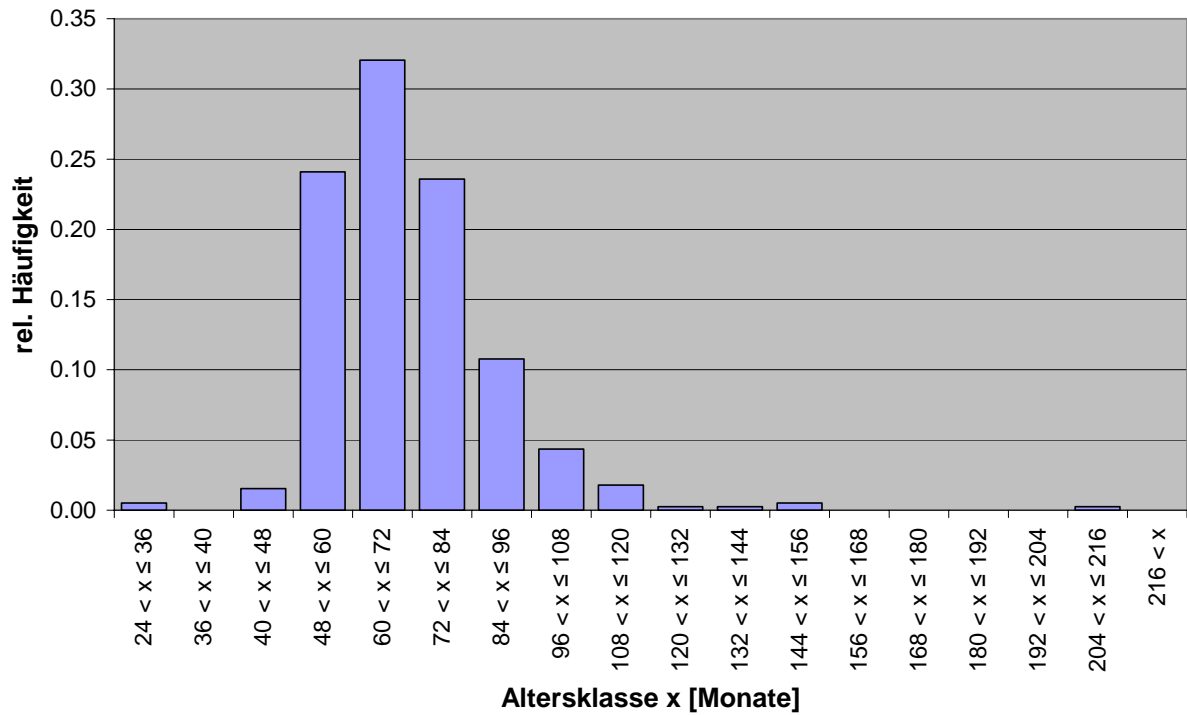


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung des Lebensalters von in Deutschland geborenen Rindern, bei denen BSE amtlich festgestellt wurde

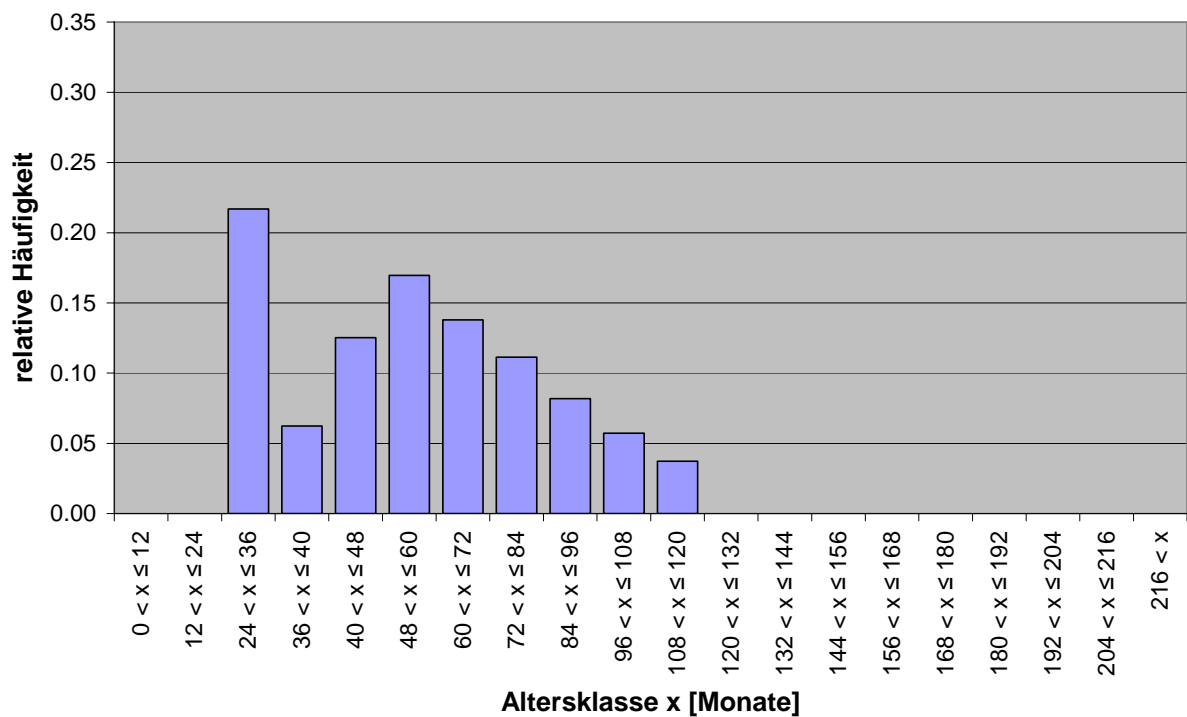


Abb. 4: Häufigkeitsverteilung des Lebensalters von Rindern (> 24 Monate), die 2005 aus der Population ausgeschieden sind.

Bestimmung des Expositionszeitraumes

Es kann angenommen werden, dass sich Rinder geburtsnah (d.h. in den ersten Lebensmonaten) mit dem BSE-Erreger infizieren. Unter dieser Voraussetzung ist die Verteilung der Geburtsdaten der Rinder, bei denen BSE amtlich festgestellt wurde, eine annähernd gute Beschreibung des Expositionszeitraums. Mit Hilfe eines Kerndichteschätzers der Geburtsdaten lässt sich der Zeitraum der Exposition gegenüber dem BSE-Erreger charakterisieren (Abb. 5). Die Kerndichteschätzung dient dazu, die Verteilung von Daten mit mathematischen Verfahren zu glätten, so dass eine stetige Schätzung der Verteilung entsteht.

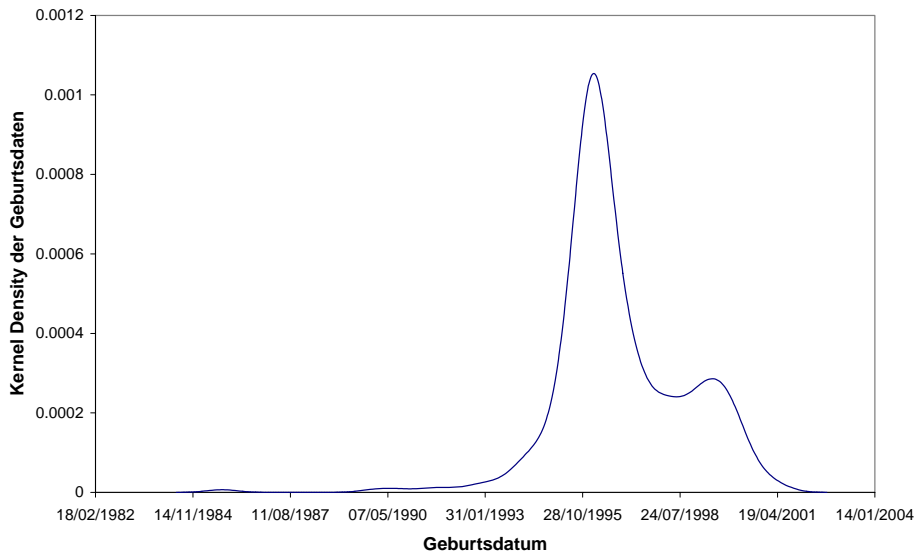


Abb. 5: Verteilung der Geburtsdaten zur Beschreibung des Zeitraums der Exposition gegenüber dem BSE-Erreger

Anhand der Abbildung 5 wird deutlich, dass die Verteilung der Geburtszeiträume bimodal ist. Dies kann wie folgt interpretiert werden: Für alle europäischen Länder wird davon ausgegangen, dass die Infektion der einheimischen Rinderpopulation durch den Import von Erreger-haltigen Risikomaterialien oder BSE-infizierten Rindern erfolgte (external challenge). Innerhalb eines Landes hängt die Weiterverbreitung des Erregers von spezifischen Bedingungen ab, die sich mit dem Begriff der internen Stabilität beschreiben lassen (internal stability, siehe hierzu auch europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out120_en.pdf für Deutschland).

Die bimodale Verteilung der Expositionszeitpunkte kann so interpretiert werden, dass man die erste Spitze der Kurve dem „external challenge“ und die zweite Spitze der „internal stability“ zuordnet. Anzumerken ist allerdings, dass der erste Expositionszeitraum, der dem external challenge zugeordnet wird, wahrscheinlich nur teilweise durch die vorhandenen Daten abgebildet wird. Man kann annehmen, dass Tiere, die diesem external challenge unterlagen, das heißt schon vor den ersten erkannten BSE-Fällen mit dem Erreger infiziert waren, zumeist schon vor der Einführung der aktiven Surveillance aus der deutschen Rinderpopulation ausgeschieden sind, also als unerkannte BSE-Fälle gestorben oder verendet sind oder geschlachtet wurden. Aus Abbildung 5 kann somit nicht geschlossen werden, dass vor dem Anstieg der Kurve kein Eintrag von BSE in die Rinderpopulation stattgefunden hat. Aus dieser Zeit gibt es einfach keine Tiere, die als BSE-infiziert diagnostiziert werden konnten, weil die meisten Rinder nicht so lange gelebt haben, dass die Schnelltests, die ab dem Jahr 2000/2001 verfügbar wurden und mit denen große Tierzahlen untersucht werden konnten, bei diesen Tieren anwendbar gewesen wären. Auch mit einer zeitlich heterogenen Exposition (zum Beispiel durch eine im Laufe der Zeit unterschiedlich starke Kontamination von Rinderfutter mit dem BSE-Erreger) kann der bimodale Verlauf der Kurve erklärt werden.

In jedem Fall lässt sich erkennen, dass die Bedingungen, die in Deutschland vor Einführung spezieller Schutzmaßnahmen gegen die Ausbreitung des BSE-Erregers herrschten, nicht geeignet waren, die Ausbreitung des Erregers vollständig zu verhindern.

Potenzielle Risikofaktoren für das Auftreten von BSE in ausgewählten Bundesländern

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen an der Ludwig-Maximilians-Universität in München sowie an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurde nach potenziellen Risikofaktoren für das Auftreten von BSE bei in Deutschland geborenen Rindern gesucht. Zu diesem Zweck wurden Bayern, Niedersachsen und Schleswig-Holstein ausgewählt, weil dort Fallzahlen vorlagen, die es möglich erscheinen ließen, potenzielle Risikofaktoren statistisch sichern zu können. Das FLI analysierte die Situation in Schleswig-Holstein. Bis zum 30.09.2005, dem Endpunkt der Studie, waren in Schleswig-Holstein 32 BSE-Fälle festgestellt worden. Die verfügbaren Daten zu diesen Fällen sind in der BSE-Datenbank des FLI gespeichert. Sie wurden mit Daten aus einer Standardpopulation der Rinder haltenden Betriebe in Schleswig-Holstein verglichen. Die Daten zu der Standardpopulation wurden im Rahmen einer so genannten „Basiserhebung“ gewonnen. Mit Hilfe der Methode der indirekten Standardisierung wurde die Prävalenz verschiedener struktureller Parameter und Managementfaktoren der von BSE-Fällen betroffenen Betriebe in Schleswig-Holstein mit der Standardpopulation schleswig-holsteinischer Rinderbetriebe (Stand 2003) verglichen. Die methodische Vorgehensweise war mit derjenigen abgestimmt, die für die vergleichbaren Daten aus Niedersachsen angewendet wurden, um zu einem späteren Zeitpunkt die Daten beider Länder gemeinsam betrachten zu können. Eine statistisch signifikante Assoziation des Auftretens von BSE mit der Verfütterung von Milchaustauscher wurde festgestellt (SPR=1.82; 95% CI: 1.15 – 2.73). Darüber hinaus bestanden deutliche Hinweise auf eine Assoziation des Auftretens von BSE mit dem Halten von Schweinen und/oder Geflügel in den von BSE betroffenen Betrieben (SPR=2.64, 95% CI 1.37 – 4.62). Dieses Ergebnis erlaubt den Schluss, dass eine Kontamination von Rinderfutter mit Futter, das für andere Tierarten (Hühner, Schweine) bestimmt war, vorgekommen sein könnte. Auch das Verfüttern von Hühner- oder Schweinefutter an Rinder kann das Ergebnis erklären. Hinweise auf eine Rassedisposition bezüglich des Auftretens von BSE ergaben sich nicht.

IV. LAUFENDE FORSCHUNGSPROJEKTE

1. VIREN

1.1 PICORNAVIREN

1.1.1 Maul- und Klauenseuchevirus (MKSV)

Homologe und heterologe Schutzwirkung von MKS-Vakzinen

Brehm, K., Kumar, N., Strebelow, H.-G. und Haas, B.*

Im Rahmen des EU-Projektes FMD_ImproCon werden homologe und heterologe Rinder-Challenge-Experimente mit den MKS-Stämmen A₂₂ Irak, A₂₄ Cruzeiro, A Iran96 und A Iran99 nach der Vorschrift der „European Pharmacopoeia“ durchgeführt. 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. 2005 wurden sechs Rinder-Challenge-Experimente durchgeführt. Es zeigte sich dabei ein Teilschutz auch gegen eine deutlich heterologe Belastungsinfektion. Von den Versuchstieren werden Blutproben sowie Nasentupfer-, Speichel- und Rachenschleimproben genommen, um die Wirkung der Impfung nicht nur klinisch, sondern auch hinsichtlich Virusausscheidung und Titerverlauf in verschiedenen diagnostischen Verfahren zu erfassen. Zur Zeit werden die Proben aus diesen Experimenten untersucht. Es deutet sich an, dass ein guter klinischer Impfschutz mit geringer Virusausscheidung korreliert.

Zur Charakterisierung der Challenge-Virusstämme und mit Blick auf die Notwendigkeit der Charakterisierung von Virusisolaten nach einem MKS-Ausbruch wurden die Methoden der RT-PCR für das VP1 aller sieben MKS-Serotypen und für die Direktsequenzierung der PCR-Amplifikate etabliert. PCR-Primer und Sequenzier-Primer entsprechen den Primern, die von N.J. Knowles und A.R. Samuel auf der Homepage des WRL-FMD veröffentlicht wurden.

Sequenziert wurden O Manisa (Riems), O Manisa (WRL-FMD), A₂₂ Irak, A Iran2/97, C₁ Noville, Asia Shamir, SAT-1 Zimbabwe, SAT-2 Zimbabwe und SAT-3 Zimbabwe. Die ermittelten Sequenzen stammen aus dem VP1-Bereich des MKSV-Genoms. Für den Sequenzvergleich wurden VP1-Sequenzen aus der Sequenz-Datenbank des OIE-/FAO-Weltreferenzlabors für MKS verwendet. Es wurde eine eigene Datenbank erstellt.

Vergleichende Untersuchungen von RNA-Extraktionsverfahren und PCR-Protokollen

Hoffmann, B.*, Haas, B. und Beer, M.

Alle Untersuchungen von Proben aus Beständen mit klinischen Symptomen, welche einen MKS-Verdacht begründen – in der Regel also Proben zum Virusnachweis – sowie alle Proben für serologische Abklärungsuntersuchungen mittels Neutralisationstest müssen weiterhin auch im Krisenfall am FLI erfolgen. Daher muss der mögliche Probendurchsatz am FLI gesteigert werden, insbesondere für Proben zum Virusnachweis. Der erste Schritt hierzu war die Etablierung der „one-tube RT *real-time* PCR“ für MKSV. Die „one-tube RT *real-time* PCR“ des FLI wurde im Rahmen eines vom Weltreferenzlabor für MKS durchgeführten Ringtests weiter validiert. Es wurden dabei alle Proben richtig erkannt, auch solche, die in anderen Verfahren große Probleme bereiteten.

In Vorbereitung auf die Beschaffung eines Extraktionsroboters wurde eine vergleichende Studie mit acht Anbietern durchgeführt. Ein wichtiges Kriterium war die Fähigkeit, Kontaminationen zwischen und innerhalb von Platten zu vermeiden. Außerdem wurde die Effizienz der RNA-Extraktion als Voraussetzung einer hohen Sensitivität sowie die Flexibilität und Offenheit der Soft- und Hardware bewertet – letztere im Hinblick auf die Forderung, dass das Gerät sowohl für magnetische als auch für Vakuum-Trennverfahren und dabei jeweils für verschiedene Extraktionskits und Protokolle einsetzbar sein sollte.

Die Proben wurden nach Schemata auf die Platten verteilt, die mit dem Ziel der Entdeckung von Kontaminationen entworfen worden und den Teilnehmern nicht bekannt waren. Um Kontaminationen in der Vorbereitungsphase der Untersuchung zu vermeiden, wurden zunächst die negativen und erst nach Verschluss der Wells die Titrationsreihen positiver Proben in die Platten gegeben. Die verschlossenen

Platten wurden auf Trockeneis an die Teilnehmer versandt, welche die Extraktionen in ihren eigenen Laboratorien durchführten und Platten mit extrahierter RNA zurückschickten. Aus Sicherheitsgründen wurde bei der Untersuchung die MKSV-RNA durch BVDV-RNA ersetzt. Die zurückgesandten Platten wurden mittels RT *real-time* PCR analysiert. Bei falsch positiven oder zweifelhaften Ergebnissen wurde die PCR wiederholt, um auszuschließen, dass solche Ergebnisse auf Fehlern während der Auswertung beruhen.

Zwei Hersteller verwendeten magnetische Trennsysteme und sechs Firmen Vakuum-Trennverfahren. Während alle Geräte eine gute Effizienz bei der Extraktion zeigten und keine Verschleppungen zwischen den Platten vorkamen, zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Kontamination innerhalb der Platten, welche von keinem System vollständig vermieden werden konnte. Zwei Geräte wurden diesbezüglich als sehr gut, drei als gut und zwei als unzureichend bewertet. Es wurde das Gerät beschafft, welches den Anforderungen insgesamt am besten entspricht. Mit diesem Gerät werden zur Zeit Verfahren erprobt, um hohe Werte für Probendurchsatz und Sensitivität mit geringer Gefahr von Kontamination zu verbinden und positive Resultate hinsichtlich ihrer Gültigkeit abzusichern.

Etablierung eines Bestätigungstests für den serologischen Nachweis von MKS-Nichtstrukturproteinen

Höhle, C., Kumar, N., Keil, G.M., Dauber, M. und Haas, B.*

Für die serologische Erkennung einer MKS-Infektion in einer geimpften Population müssen Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen die Nichtstrukturproteine (NSP) des MKSV eingesetzt werden, weil die Impfung Antikörper gegen Strukturproteine induziert. Während seit kurzem kommerzielle Screening-ELISA für Antikörper gegen die NSPs des MKSV zur Verfügung stehen, besteht nach wie vor Bedarf an zusätzlichen Testverfahren. Um einen Profiling-ELISA für Antikörper gegen MKS-NSP zu etablieren, wurden die Baculo-exprimierten Nichtstrukturproteine 3ABC(C¹⁶³G), 3A, 3B, 3C and 3D (carboxyterminal 6xHis-tagged) mittels Ni-Agarose-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Identität der exprimierten Proteine wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper aus dem IZSLE, Italien geprüft. Außerdem wurde geprüft, ob sie mit bovinen Infektionsseren im ELISA reagieren. Weil in ersten Versuchen das Protein 3A das beste Verhältnis von Signal zu Hintergrund zeigte, wurde es als Basis für die Entwicklung eines ELISA ausgewählt. Monoklonale Antikörper wurden als Fänger auf die Platten gebunden und, nach Bindung des 3A Proteins, bovine Seren in den Platten inkubiert. Gebundene bovine Antikörper wurden mittels anti-Rind-Peroxidase und OPD nachgewiesen. Eine erste Bewertung wurde mit je 217 Seren von negativen, geimpften sowie infizierten Rindern vorgenommen. Nimmt man den Ceditest-FMDV-NS als vorläufigen Goldstandard, beträgt die Sensitivität des Tests 99,5 %. Die Spezifität beträgt nach ersten Versuchen 98,6 %. Außerdem wurden Mäuse mit gereinigten 3A-, 3D- und 3ABC-Proteinen immunisiert, um eigene monoklonale Antikörper zu gewinnen. Bisher wurden vier Hybridome aus einer "3ABC-Fusion" gefunden, die eine starke Reaktion mit dem Protein 3A zeigen, und zwei davon zur Produktion größerer Mengen von Antikörpern ausgewählt. Diese beiden Mabs (5G1 and 8H8) werden nun auf ihre Eignung als Fänger-Antikörper getestet.

Es könnte sich aber herausstellen, dass die Reaktivität von Infektionsseren mit den meisten NSPs so gering ist, dass die Empfindlichkeit eines Profiling-ELISA als Bestätigungstest nicht ausreicht. Daher werden zusätzlich Speichelproben von geimpften und anschließend infizierten Tieren gesammelt. Sie sollen auf IgA-Antikörper gegen Strukturproteine des MKSV untersucht werden. In einer Studie am IAH, Pirbright wurde gefunden, dass solche Antikörper auf eine Infektion hindeuten, was mit eigenen vorläufigen Ergebnissen übereinstimmt.

Entwicklung neuartiger Impfstoffe gegen MKSV

Keil, G.*, Höhle, C. und Haas, B.

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 hergestellte 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 sowie die 3C-Protease (3C^{pro}) gemeinsam zu exprimieren. Dazu wurde zunächst cDNA für die P1-2A kodierende Region mit den Codons für 3C^{pro} sowie die 3D-Polymerase im gleichen Leserahmen fusioniert und in einen Transfervektor zur Rekombination in das Genom des bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) integriert. Die 3D-Polymerase wurde hinzugefügt, da diese ebenfalls Bestandteil von Virionen ist. Die resultierende P1-2A-3C^{pro}-3D Kasette wurde in das Genom von BHV-1 kloniert. Die erhaltenen Rekombinanten exprimierten das P1-2A Polyprotein, 3C^{pro} und die 3D-Polymerase. Allerdings war in Zellen, die mit der BHV-1 Rekombinanten infiziert wurden, im Gegensatz zur Abspaltung von 3C^{pro} und 3D keine Spaltung des P1-2A-Polyproteins nachweisbar. Die molekularen Ursachen für die fehlende P1-2A-Spaltung werden gegenwärtig untersucht.

Die Bestimmung der Wirksamkeit der MKS-Vakzinierung in Impfpufferzonen im südlichen Kaukasus – Bedeutung der serologischen Überwachung

Pöttsch, C.J.*, Brocchi, E., Grazioli, S., Greiner, M., Rozstalnyy, A., Staubach, C. und Sumption, K.

Eine serologische Überwachungsstudie wurde in der Maul- und Klauenseuche (MKS)-Impfpufferzone in der südlichen Kaukasusregion in Georgien, Armenien und Aserbaidschan durchgeführt. Die Untersuchungsziele sind die Prävalenzschätzung und die Beschreibung der geographischen Verteilung infizierter Tiere anhand von Antikörpern gegen Struktur- (SP) und Nichtstrukturproteine (NSP) des MKS-Virus. Außerdem sollen die Ergebnisse in Beziehung zu den Einflüssen von Impfung und der Zirkulation von Infektion interpretiert werden.

Die Wirksamkeit serologischer Untersuchungen zur Überwachung von Impfprogrammen über die Bestimmung von SP-Antikörperprävalenzen und die Entdeckung subklinischer Infektionen über NSP-Antikörper sollen eingeschätzt werden. Wichtig ist auch die Interpretation von NSP-positiven Testergebnissen, die von mit ungereinigten MKS-Vakzinen geimpften Tieren stammen. Die Bedeutung des Studiendesigns und die verwendeten analytischen Methoden für die Einschätzung des Impferfolgs in anderen MKS-Impfpufferzonen werden momentan diskutiert.

Mitarbeit bei der Planung der Sero-Überwachung für Maul- und Klauenseuche in der türkischen Region Thrakien für das Jahr 2006

Pöttsch, C.J.

Auftraggeber: European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease (EUFMD), Food and Agriculture Organization of the United Nations

Von den Ergebnissen der serologischen Überwachung für die Region Thrakien aus dem Jahr 2005 ausgehend wurden geographische Einheiten und Zeiträume mit höherem Risiko für das mögliche Auftreten von MKS identifiziert. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die serologische Überwachung für das Jahr 2006 in dieser Region geplant.

1.2 CALICIVIREN

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

Die Familie *Caliciviridae* umfasst eine Gruppe von Viren, deren Verwandtschaft durch eine charakteristische Morphologie der unbehüllten Viruspartikel, ein vergleichbar großes einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität, ähnliche Genomorganisationen und Sequenzhomologien belegt ist. Neben humanpathogenen Erregern, die häufig Ursache für epidemieartig auftretende Gastroenteritiden sind, gehören verschiedene tierpathogene Viren zu den Caliciviren. Während Infektionen mit RHDV zu perakut verlaufenden, i.d.R. tödlichen Erkrankungen bei Kaninchen der Spezies *Oryctolagus cuniculus* mit prominenter Leberpathologie und hämorrhagischem Syndrom führen, verursacht FCV Erkrankungen des Atmungstraktes bei Katzen.

Analyse zur Genomorganisation und Strategie der Genexpression

Luttermann, C. und G. Meyers*

Das RHDV ist der Prototyp einer Gruppe von Viren, die das Genus *Lagovirus* bilden, während das FCV ein prominenter Vertreter des Genus *Vesivirus* ist. Das Genom der Lagoviren enthält zwei offene Leserahmen (ORF), wobei der ORF1 die Gene für sämtliche Nichtstrukturproteine und das Hauptkapsidprotein umfasst und in ein hypothetisches Polyprotein translatiert wird, das proteolytisch in die reifen Virusproteine gespalten wird. Nahe am 3'-Ende des Genoms befindet sich der ORF2, der für ein kleineres Kapsidprotein kodiert (VP10 beim RHDV). In infizierten Zellen findet man zusätzlich zum Genom eine prominente subgenomische RNA, die ca. 2,4 Kilobasen lang ist und die Gene für das Hauptkapsidprotein und das VP10 in zwei getrennten überlappenden ORFs enthält. Diese RNA ist die Hauptquelle für die beiden Strukturproteine. Die Genomorganisation des FCV ist der des RHDV ähnlich, beinhaltet aber drei ORFs, weil in diesem Falle das Hauptkapsidprotein in einem separaten Leserahmen (ORF2) kodiert wird, so dass der 3'-terminale Rahmen den ORF3 des FCV darstellt. Der Mechanismus, der für die Translation des am 3'-Ende der RNA-lokalisierten ORF sorgt, wird seit einiger Zeit am Beispiel des RHDV und FCV im Detail untersucht. Für beide Viren wurde nachgewiesen, dass die Expression dieses Leserahmens auf einem bisher nicht beschriebenen Translationsterminations-/Reinitiationsmechanismus basiert. Das Besondere am caliciviralen Expressionsmechanismus 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 gezielt hergestellten Sequenzmutanten zwei Sequenzmotive identifiziert, die für die Initiation der Translation essentiell sind. Eines dieser Motive ist bei Caliciviren konserviert. In weiteren Untersuchungen soll analysiert werden, worin die Bedeutung dieser Sequenzmotive liegt und mit welchen Molekülen sie interagieren. Die Arbeiten zum RHDV zeigten zudem, dass die Sequenz der Stop-/Start-Region entgegen den Erwartungen ein hohes Maß an Flexibilität erlaubt. Dieser Befund trug dazu bei, die Modelle für den Mechanismus, der dieser ungewöhnlichen Translationsinitiation zu Grunde liegt, zu präzisieren und weiter zu entwickeln. In den zukünftigen Studien sollen diese Modelle experimentell überprüft werden.

Nachweis der Persistenz von RHDV-Genom in rekonvaleszenten sowie immunisierten und danach Feldvirus-exponierten Kaninchen

Gall, A., Hoffmann, B., Teifke, J.P. und Schirmeier, H.*

(in Zusammenarbeit mit der Riemser Arzneimittel AG, Greifswald-Insel Riems)

Im Vorjahr ist eine RT *real-time* PCR zum Nachweis des RHDV etabliert und validiert worden. Mit dieser Methode wurde in einer tierexperimentellen Studie RHDV-RNA bis mindestens 15 Wochen nach Infektion in Organen und Exkreten rekonvaleszenter Tiere nachgewiesen. Es konnte in Fortsetzung der Untersuchungen jedoch kein Antigen, infektiöses Virus oder virales *full length*-Genom nachgewiesen werden. Dabei müssen sowohl quantitative Effekte – bzw. die zu geringe Sensitivität der verfügbaren Methoden – als auch inhibitorische Effekte durch die hohen Antikörper-Titer der rekonvaleszenten Tiere berücksichtigt werden. In einem zweiten Tierversuch wurde die Persistenz viraler RNA in immunisierten und danach Feldvirus-exponierten Kaninchen untersucht. Dabei sind sowohl mit einer kommerziellen inaktivierten Virusvakzine als auch mit einer Subunitvakzine geimpfte Tiere als *carrier* von RHDV-RNA bis zum Zeitpunkt von mindestens 15 Wochen nach Infektion identifiziert worden. Erstmals konnte somit innerhalb experimenteller Studien der Nachweis einer Persistenz viraler RNA sowohl in rekonvaleszenten als auch in immunisierten und danach Feldvirus-exponierten Kaninchen erbracht werden, deren Bedeutung für die Epidemiologie der Erkrankung weiter abzuklären sind.

RHDV-Replikation in Zellkulturen

Gall, A., Wege, H., Riebe, R., Köllner, B. und Schirmeier, H.*

Die Arbeiten zur Untersuchung der Replikation des RHDV in Zellkulturen wurden weitergeführt. Insgesamt sind mehr als 50 Zelllinien im Rahmen eines entwickelten Screeningverfahrens mit Filtraten einer Lebersuspension RHDV-infizierter Kaninchen inokuliert und mittels indirekten Immunfluoreszenztests, Hämagglutinationstests sowie Antigen-ELISA auf eine Empfänglichkeit gegenüber RHDV

getestet worden. Mehrere Zellen unterschiedlicher Spezies – insbesondere auf das Kaninchen zurückgehende – erwiesen sich als infizierbar, doch in keinem Fall konnte das Virus stabil passagiert werden. Die Fortsetzung der Infektionsversuche mit Primärkulturen (Zellen aus Thymus, großem Netz und bronchoalveolärer Lavage von Kaninchen) ergab, dass es sich bei den im indirekten Immunfluoreszenztest positiven Zellen (bis zu 80 % in der Mischkultur) vermutlich um Makrophagen handelt. Exemplarisch wurde die Replikation des RHDV nach Inokulation und Transfektion anhand der Zelllinie RLI-R mittels RT *real time* PCR untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine produktive *In-vitro*-Vermehrung nach Transfektion von RNA zeitlich begrenzt auftritt, diese sich jedoch nicht zu einer stabilen Virusreplikation fortführen lässt. Durch Transfektion ist es gelungen, RHDV in Größenordnungen herzustellen, die hinsichtlich des HA-Titers kommerziellen Vakzinen entsprechen. Die Immunogenität einer hieraus formulierten Versuchsvakzine war mit der einer kommerziellen Vakzine vergleichbar, und es konnte eine protektive Immunität im Kaninchen induziert werden.

Expression des Hauptstrukturproteins des RHDV in transgenen Pflanzen – Untersuchungen zur Antigenität und Immunogenität

Hammer, M., Keil, G., König, P. und Schirrneier, H.*

(in Zusammenarbeit mit AG Agrobiotechnologie der Universität Rostock, FBN Dummerstorf, Norika GmbH, Groß Lüsewitz und Biomath, Rostock)

Die als „edible vaccines“ bekannte Herstellung immunisierender Antigene in transgenen Pflanzen ist für bestimmte Anwendungsbereiche von grundsätzlicher Bedeutung. An den Modellen Kapsidprotein des RHDV (VP60) und VP7 des Rotavirus wurde die Herstellung immunogener Proteine in nachwachsenden Rohstoffen untersucht und optimiert. Neben der Synthese künstlicher Leserahmen unter Verwendung pflanzlicher Codonpräferenzen wurden Konstrukte und Pflanzen generiert, die durch Fusion mit Cholera-toxin B (ctxB) auf eine Steigerung der Immunität nach oraler Applikation zielten. Es wurden unterschiedliche Konstrukte eingesetzt, die sich in Synthese und Proteinspeicherung unterschieden (Fusion von ctxB mit/ohne Signalpeptid für das ER und mit/ohne ER Retentionssignal). Prinzipiell gelang es, in Tabak, Kartoffeln und Möhren das Kapsidprotein des RHDV in nachweisbaren (ELISA, Western Blot) Mengen zu exprimieren. Eine Anpassung der synthetischen Leserahmen an die pflanzliche Codonpräferenz führte zu einer deutlichen Steigerung der auch Pflanzensorten-abhängigen Expression. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzen ließen keinen durchgängig signifikanten Vorteil eines bestimmten Konstruktes erkennen. Die Verwendung eines Knollen-spezifischen Promotors bewirkte keine Steigerung der Expressionsstärke. Fusionsproteine ctxB-VP60 wurden schlecht exprimiert. Die immunogene Wirkung der generierten Pflanzen wurde nach parenteraler und oraler Verabreichung an Kaninchen und Mäuse geprüft. Dabei induzierte transgenes Pflanzenmaterial in VP60 Mengen bis zu 450 ng (i.m.) bzw. im Grammbereich weder Serokonversion noch Schutz vor experimenteller Infektion. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch originäres VP60 aus Lebermaterial bzw. rekombinant in Bakuloviren hergestellt in Mengen bis zu 240 µg VP60/Dosis nach oraler Applikation keine belastbare Immunität induziert. Dagegen führte die i.m.-Verabreichung von 8,5 ng bakuloexprimiertem VP60 zu einem Schutz gegenüber einer RHDV-Infektion. Weiterhin erwies sich VP60, generiert nach Transfektion von Säugerzellen mit Pflanzencodon-präferierten DNA-Expressions-kassetten nach parenteraler Applikation als immunogen für Mäuse. Das zeigt, dass neben der Proteinmenge vor allem auch qualitative Eigenschaften und der physikochemische (partikuläre) Zustand des Antigens von wesentlicher Bedeutung zu sein scheinen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse des nunmehr abgeschlossenen Verbundprojektes, dass vor einer breiten praktischen Anwendung von *edible vaccines* noch eine Reihe von Problemen einer wissenschaftlichen Klärung zugeführt werden müssen.

1.2.2 Noroviren

1.2.2.1 Untersuchungen zur Norovirusinfektion des Rindes

Calicivirus-ähnliche Viren wurden erstmals als Ursache für Durchfallerkrankungen bei Kälbern im Vereinigten Königreich und in Deutschland in den Jahren 1978 bzw. 1980 beschrieben. In experimentellen Studien konnte die Pathogenität dieser Viren festgestellt werden. Ihre Vermehrung in Zellkulturen ist bisher nicht gelungen und Informationen zur Genomstruktur wurden erst vor wenigen Jahren von zwei

Isolaten erhalten (Bo/Newbury2/1978/UK und Bo/Jena/1980/DE). Beide Virusisolate sind charakterisiert durch ein Genom mit einer Größe von 7,3 kb und drei Leserahmen. Auf der Basis dieser genetischen Struktur wurden diese Viren als Genogruppe III der Norviren in die Familie *Caliciviridae* taxonomiert. In den letzten Jahren konnten wir die weite Verbreitung der Norovirusinfektion bei Rindern in Deutschland nachweisen, wobei der Genotyp 1 vorherrschend war.

Bovine Noroviren der Genotypen 1 und 2 zeigen Verwandtschaft mit humanen Noroviren

Oliver, S.L., Batten, C., Deng, Y., Elschner, M.*, Otto, P., Charpilienne, A., Clarke, I.N., Bridger, J.C. und Lambden, P.

In vergleichenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die bovinen Calicivirus-Stämme (Bo/Jena/DE und Bo/Newbury2/UK) zwei verschiedene Genotypen darstellen, die als Genogruppe III der Gattung Norovirus innerhalb der Familie *Caliciviridae* angehören. In den Untersuchungen wurden erstmals Testverfahren angewendet, um die beiden Genotypen feststellen und charakterisieren zu können. Im ELISA wurde die Reaktion von rekombinanten Viruspartikeln (VLPs) von Jenavirus mit Rekonvaleszenzseren von Kälbern getestet, die mit Jena- bzw. Newbury2-Virus infiziert waren sowie mit einem monoklonalen Antikörper (CM39). Beide Genotypen Jena (Genotyp 1) und Newbury2 (Genotyp 2) zeigten keine bzw. nur geringe Kreuzreaktivität mit den heterologen Rekonvaleszenzseren, die einen homologen IgG-Titer von 3,1 bis 3,3 log₁₀ aufwiesen. Der monoklonale Antikörper reagierte sowohl mit Jenavirus als auch Newbury2-Virus. Das Epitop des Kapsidproteins vom Jenavirus umfasst neun Aminosäuren (³¹PTAGAQIAA³⁹) und ist beim Isolat Newbury2 nicht vollständig konserviert (³¹PTAGAPVAA³⁹). Im molekularen Modell zeigte sich, dass das Epitop im NH₂-Terminus des Viruskapsids lokalisiert ist. Mit dem monoklonalen Antikörper reagierten interessanterweise auch VLPs humaner Norovirusisolate (Genogruppe II, Genotyp 3) sowohl im ELISA als auch im Western Blot. Diese Tatsache beweist, dass die beiden sich im Sero- bzw. Genotyp unterscheidenden bovinen Norovirusisolate mindestens ein kreuzreagierendes Epitop besitzen. Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Epidemiologie und Immunophylaxe der Norovirusinfektion des Rindes.

1.3 CORONAVIREN

1.3.1 Virus der infektiösen Bronchitis des Geflügels (AIBV)

Das Virus der aviären infektiösen Bronchitis (AIBV) ist ein Coronavirus aus der Ordnung Nidovirales. Coronaviren sind umhüllte Viren, deren Genome aus einer linearen, einzelsträngigen RNA positiver Polarität mit einer Größe von etwa 28 kb bestehen. AIBV ist hochpathogen für Hühner und repliziert überwiegend im Respirationstrakt sowie Ovidukt und Niere. Aus infizierten Tieren isolierte Stämme können in Bruteiern vermehrt werden, vermehren sich aber erst nach Adaptierung auf Zellkulturen.

In infizierten Zellen werden sechs mRNAs synthetisiert, von denen die mRNA 1 der genomischen RNA entspricht. Diese kodiert für zwei Polyproteine, die nach proteolytischer Prozessierung die Replikations-/ Transkriptionskomplexe bilden. Die subgenomischen mRNAs sind monocistronisch und kodieren für die Strukturproteine.

Entwicklung eines reversen genetischen Systems für AIBV

Keil, G.*

Da Versuche, infektiöses AIBV in embryonalen Hühnereizellkulturen, Trachealringzellkulturen oder embryonierten Hühnereiern durch chemische Transfektion mit *in vitro* von einem Gesamtklon (pAIBV-Riems) synthetisierter RNA zu erhalten, nicht zur Isolierung von vermehrungsfähigem AIBV führten, wurden unterschiedliche Vero Zelllinien mit cRNA transfiziert. Die transfizierten Kulturen wurden mehrmals passagiert und auf AIBV Replikation geprüft. Auch dieser Ansatz ergab kein infektiöses Virus. Allerdings gelang es auch nicht, den für die Herstellung von pAIBV-Riems verwendeten virulenten AIBV

Stamm M41 auf die verwendeten Vero Zellen zu adaptieren. Für zukünftige Versuche soll daher der Zellkultur-adaptierte AIBV Stamm Beaudette verwendet werden.

1.3.2 Porcine Coronaviren

Untersuchungen zur Pathogenität, Replikationsfähigkeit und Fremdgenexpression rekombinanter porziner Coronaviren (r-TGEV)

Saenger, K., von Felbert, I., Granzow, H., Poster, U. und Teifke, J.P.*

(in Zusammenarbeit mit Enjuanes, L. [CNB, Madrid, Spanien]; Domingo, E. [CBMSO, Madrid, Spanien]; Plana-Duran, J. [FDVSA, Vall de Bianya, Spanien]; Brusckhe, C.J.M. [ID-Lelystad, Niederlande]; Barnett, P. [IAH, Pirbright Laboratory, UK] und McCullough, K. [IVI, Mithras, Schweiz]), EU-Projekt (QLK2-CT-2002-00825, „Novel coronavirus vector-based vaccine for prevention of foot-and-mouth disease“)

Ziel dieser Arbeiten ist die Etablierung eines TGEV Vektorsystems als Markervakzine für eine orale Immunisierung gegen das Maul- und Klauenseuche Virus (MKSU). Zu diesem Zweck wurden rekombinante TGEV hergestellt, die auf dem attenuierten Impfvirus TGEV PUR46-MAD basieren und verschiedene Restriktionsendonuklease-Spaltstellen, eine Deletion des Gens 7 (r-TGEV-Sc11-Δ7) sowie zusätzlich das VP1-Gen des MKSU enthalten. Die r-TGEV wurden im Hinblick auf ihre Pathogenität, Replikationsfähigkeit und Stabilität im Schwein untersucht. Weiterhin wurde *in vitro* und *in vivo* die VP1-Fremdgenexpression und Antikörperbildung gegen das VP1 getestet.

Zu diesem Zweck wurden Saugferkel im Alter von drei Tagen mit verschiedenen r-TGEVs infiziert. Tiere, die mit r-TGEV-Sc11-Δ7 infiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den anderen Gruppen höhere Gewichtszunahmen, ein gutes Allgemeinbefinden und höhere Überlebensraten. Makroskopisch zeigten Tiere aller Gruppen ähnliche, für TGE typische Läsionen, die durch eine transparente Dünndarmwand und Hyperämie der Serosagefäße gekennzeichnet waren. Histopathologisch wiesen die mit r-TGEV-Sc11-Δ7 infizierten Tiere vor allem im Jejunum und Ileum eine im Gegensatz zu den übrigen Versuchsgruppen milde Atrophie und Fusion der Zotten mit wenigen Epithelzellnekrosen auf. Trotz dieser verminderten Virulenz war die Virusreplikation in infizierten Tieren effizient. Ultrastrukturelle Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse, da hier Coronaviren in ansonsten unveränderten Enterozyten des FAE und in Makrophagen nachweisbar waren.

Eine VP1 Fremdgenexpression durch r-TGEV-Sc11-VP1 konnte in Zellkultur, nicht jedoch immunhistologisch in Gewebsschnitten nachgewiesen werden. Auch führte die Immunisierung von Schweinen mit r-TGEV-Sc11-VP1 zu keinem ausreichenden Schutz gegenüber einem Challenge mit MKSU.

1.4 FLAVIVIREN

1.4.1 Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV)

Entwicklung von rekombinanten Markerimpfstoffen

Meyers, G.* und Schürmann, E.-M.

Ein zentrales Problem von Pestiviren ist die Übertragung der Viren auf die Föten in trächtigen Tieren. Als Folge dieser diaplastaren Infektion können Aborte, Mumifizierung oder Missbildung der Föten sowie die Geburt äußerlich gesunder persistent infizierter Tiere auftreten. Bei der Suche nach attenuierenden Viren zur Verwendung in neuartigen Lebendimpfstoffen ist deshalb die Frage nach den Auswirkungen von Mutationen auf das Verhalten der Viren nach einer Impfung von trächtigen Tieren von erheblicher Bedeutung.

Ein interessantes Ziel für attenuierende Mutationen bei Pestiviren stellt das Glykoprotein E^{ms} dar. Neben seiner Funktion als Strukturprotein, das für die Bildung infektiöser Viren essentiell ist, besitzt das Protein auch eine Funktion bei der Unterdrückung der Immunreaktion des Wirtes. Diese zweite Funktion ist mit einer RNase-Aktivität des Proteins gekoppelt, die bei RNA-Viren einzigartig ist und für die Vermehrung von Pestiviren in Gewebekultur nicht essentiell ist. Die Zerstörung der RNase durch gezielte Mutation

führt im natürlichen Wirt aufgrund eines bisher unbekanntem Mechanismus zu einer erheblichen Senkung der Virulenz.

Versuche mit Ferkeln hatten gezeigt, dass die Infektion mit der RNase-negativen KSPV-Mutante C-346d eine belastbare Immunität erzeugte, ohne Krankheitssymptome auszulösen. Ein besonderes Merkmal dieser Mutante war zudem, dass sie offensichtlich keine nennenswerte Virämie erzeugte, denn in mehreren unabhängigen Versuchen war ausschließlich in einem Tier zu einem einzigen Zeitpunkt Virus im Blut nachweisbar, während Wildtyp-Virus über einen längeren Zeitraum in großen Mengen im Blut zu finden war. Da Virämie als Voraussetzung für die diaplazentare Infektion angesehen werden kann, war es von Interesse zu überprüfen, ob diese Virusmutante im trächtigen Tier auf Föten übertragbar ist. Vier Tiere wurden am 62. Tag der Trächtigkeit mit der Mutante infiziert. Zur Kontrolle wurde eine zweite Gruppe mit einem bekannten Impfvirus infiziert. Die Tiere beider Gruppen zeigten nach der Infektion keine signifikanten Krankheitssymptome. Kurz vor dem errechneten Ende der Trächtigkeit wurden die Tiere getötet und die Föten untersucht. In den Tieren der Kontrollgruppe wurden 55 Föten gefunden, von denen sechs bereits tot oder mumifiziert waren. In keinem der 55 Ferkel konnte KSPV nachgewiesen werden. Die mit der Mutante infizierten Tiere enthielten 44 Ferkel, von denen ebenfalls sechs tot oder mumifiziert waren und in denen kein Virus detektierbar war. In 15 der weiteren Ferkel aus drei Sauen dieser Gruppe wurde die KSPV-Mutante nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Mutation, die die RNase-Funktion des E^{ms} zerstört und im Ferkel zu einer vollständigen Attenuierung von KSPV führt, im trächtigen Tier die Übertragung des Virus auf die Föten nicht verhindern kann. Obwohl nach Infektion mit dieser Mutante in unseren Tests keine nennenswerte Virämie zu verzeichnen war, gelangt offensichtlich soviel Virus ins Blut, dass die Infektion der Föten mit hoher Effizienz erfolgt. In weiteren Untersuchungen sollen andere attenuierende Mutationen in diesem System getestet werden.

Charakterisierung des markierten KSP-Lebendimpfstoffes CP7_E2alf in ersten Sicherheitsstudien

König, P. und Beer, M.*

(in Zusammenarbeit mit Kulcsár, G. und Barna, T., Institute for Veterinary Medical Products, Budapest, Hungary)

Cp7_E2alf, ein chimäres Bovines Virusdiarrhoe Virus, exprimiert das Hüllprotein und Hauptimmunogen E2 des KSP-Stammes Alfort187 anstelle des originären BVDV-E2. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass Haus- und Wildschweine nach einer einmaligen Impfung vor einer KSP-Belastungsinfektion umfassend geschützt waren und von Feldvirus-infizierten Tieren serologisch unterschieden werden konnten. In einer Sicherheitsstudie zur Interspezies-Übertragung wurden Rindern, Schafen, Ziegen und Kaninchen hohe Dosen von CP7_E2alf oral verabreicht. Sämtliche Tiere blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum klinisch unauffällig, weder Virämie noch Virusausscheidung wurden beobachtet. Es wurde keine nachweisbare Antikörperbildung gegen Cp7_E2alf induziert.

In einer weiteren Studie wurden Sauen in verschiedenen Trächtigkeitsstadien intramuskulär immunisiert, um potentielle transplazentale Infektion der Föten oder fruchtschädigende Wirkungen zu untersuchen. Im Vergleich zu Kontrolltieren traten keine signifikanten Unterschiede in Trächtigkeitsverlauf, Wurfgröße, Geburtsgewicht oder Gewichtszunahme der Ferkel auf. Es wurden keine präkolostralen Antikörper gegen Cp7_E2alf nachgewiesen. Antigen-ELISA und RT-PCR ergaben keine Hinweise auf eine transplazentale Infektion der Ferkel.

Diese Daten unterstreichen die Sicherheit und Unschädlichkeit des Vakzinevirus Cp7_E2alf. Die Chimäre replizierte nach oraler Infektion nur im Schwein und zeigte damit eine KSP-ähnliche Wirtsspezifität. Daher erscheint eine Übertragung von geimpften Schweinen auf Wiederkäuer oder Kaninchen unter Feldbedingungen unwahrscheinlich. Das Hüllprotein E2 bestimmt in der Zellkultur wie auch im Tier maßgeblich das Wirtsspektrum von Pestiviren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cp7_E2alf die plazentale Barriere nicht überschreitet und keine unerwünschten Nebenwirkungen in trächtigen Sauen verursacht.

Die Studien wurden von der Europäischen Union unterstützt (EU: SSP1- 501599).

Nachweis eines Marker-Lebendimpfstoffes und des konventionellen C-Stamm Impfstoffes in Blut- und Gewebeproben über einen Zeitraum von 42 Tagen

König, P.*, Lange, E., Depner, K., Hoffmann, B. und Beer, M.

Der Einsatz von KSP-Lebendimpfstoffen setzt umfassende Untersuchungen von Sicherheitsaspekten wie Impfvirus-Replikation im Wirt und einer möglichen Übertragung auf Kontakttiere voraus. Die Untersuchung der Organverteilung spielt eine wichtige Rolle bei der Weiterentwicklung von KSP-Bekämpfung und Diagnostik.

Nach intramuskulärer Immunisierung von Schweinen mit der C-Stamm-Vakzine sowie mit dem von uns entwickelten Marker-Impfstoff Cp7_E2alf wurde die Viruslast in verschiedenen Gewebeproben untersucht. Mittels Nachweis von Erbmaterial in Echtzeit (RT *real time* PCR) wurde der Gehalt an viraler RNA quantifiziert.

Beide Impfviren zeigten eine vergleichbare Organverteilung. Infektiöses Virus konnte sechs Tage nach Applikation beider Impfstoffe aus den Tonsillen in Zellkultur isoliert werden. Zu späteren Zeitpunkten war keine Anzucht möglich. Eine Virusisolierung aus Leukozyten oder weiteren Gewebeproben (Lymphknoten von Atmungs- und Verdauungstrakt, Thymus, Milz, Speicheldrüsen, Niere, Nickhaut und Markspülungen von Rippe und Brustbein) war nicht erfolgreich. Virale RNA-Sequenzen wurden in geringer Kopienzahl (< 25 Kopien pro Reaktionsansatz) in den Leukozyten von Tieren beider Gruppen bis Tag 14 nach der Immunisierung nachgewiesen. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 42 Tagen wurden in den Tonsillenproben nahezu aller Tiere positive RT-PCR Ergebnisse erzielt. In Lymphknoten und Milz waren die RT-PCR Untersuchungen bis maximal Tag 35 intermittierend positiv. Diese Daten bilden eine wichtige Grundlage für den Einsatz diskriminatorischer RT-PCR-Untersuchungen zur Unterscheidung von Impfung mit Lebendvakzinen und Feldvirus-Infektionen. Insbesondere die Tonsille erwies sich als stabiles Reservoir für virales Erbgut mit besonderer Eignung für Stamm-spezifische PCR-Untersuchungen in der KSP-Diagnostik.

Die Studie wurde von der Europäischen Union unterstützt (EU: SSP1- 501599).

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

Kaden, V.* und Lange, E.

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

Nach der erfolgreichen Bekämpfung der KSP beim Schwarzwild in mehreren Gebieten Deutschlands wurde 2005 die Vakzination in der Pfalz (Rheinland-Pfalz) fortgeführt. Die Immunisierungsergebnisse in der Pfalz haben gezeigt, dass nach den einzelnen Immunisierungsperioden im Jahre 2005 Seroprävalenzen zwischen 55 und 65 % erreicht wurden. Der letzte Seuchenfall in diesem Gebiet wurde im November 2004 festgestellt, so dass die Impfung im Jahre 2006 eingestellt werden kann, sofern keine neuen Seuchenfälle auftreten. Nach Ausbruch der KSP im ehemals infizierten Gebiet des LK Euskirchen, Nordrhein-Westfalen, wurde dort in einem relativ kleinen Gebiet sowie im angrenzenden Bereich in Rheinland-Pfalz ein neues Impfgebiet eingerichtet. Die Ursache für den erneuten Seuchenausbruch ist nicht eindeutig klar. Inwieweit ein Abweichen vom Impfschema dafür verantwortlich gemacht werden kann, bleibt offen. Die für die Tierseuchenbekämpfung zuständigen Behörden wurden von uns bei der Bekämpfung der KSP des Schwarzwildes beraten und unterstützt.

Entwicklung der Seroprävalenzen nach Vakzinierung von Wildschweinen in einer Population mit geringem Infektionsdruck

Kaden, V.*

(in Zusammenarbeit mit Hänel, A. [Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart]; Renner, Ch. und Gossger, K. [Ministerium für Ernährung und Ländlicher Raum, Stuttgart])

In Baden-Württemberg wurde die Effektivität der oralen Immunisierung der Wildschweine gegen KSP auf der Grundlage des optimierten Immunisierungsverfahrens anhand der Seroprävalenz bewertet. Bis zur dritten Vakzinationskampagne stieg die Seroprävalenz im Impfgebiet kontinuierlich an (auf 72,4 %). Danach wurde ein Abfall des Anteils Antikörper-positiver Wildschweine festgestellt, vor allem bei den

Frischlingen. Obwohl in der infizierten Zone (gefährdeter Bezirk) die Seroprävalenz nach Vakzination höher als im nicht infizierten Impfcordon war, konnte in letzterem im Prinzip die gleiche positive Entwicklung wie in der infizierten Zone festgestellt werden. Die Entwicklung der monatlichen Seroprävalenzraten bei jungen Wildschweinen während des ersten Lebensjahres zeigte, dass das neue Immunisierungsverfahren zu mehr seropositiven Frischlingen führte als frühere Verfahren. Bei Frischlingen und Überläufern waren die mittleren neutralisierenden Antikörpertiter auf etwa gleich hohem Niveau (Frischlinge im Mittel 812 ND₅₀, Überläufer 997 ND₅₀). Einzelne Wildschweine mit Antikörpern gegen KSP-Virus konnten noch für mehr als zwei Jahre nach Beendigung der Vakzination festgestellt werden.

Zur Wirksamkeit der oralen Immunisierung gegen KSP: Infektionsstudie bei tragenden Sauen

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

(in Zusammenarbeit mit Steyer, H. und Lange, B. [Riemser Arzneimittel AG])

Das Ziel der Untersuchungen war es, festzustellen, ob die orale Vakzination mit C-Stamm-Vakzine die Nachkommen vor einer *In-utero*-Infektion schützt, wenn die Infektion im mittleren Trächtigkeitsabschnitt erfolgt. Im Experiment 1 wurden zwei tragende Sauen am 35. Tage post inseminationem (p.ins.) mit einer Vakzinedosis oral vakziniert und am 75. Trächtigkeitstag mit Koslov-Virus infiziert. In einem zweiten Experiment erfolgte die orale Immunisierung von vier Sauen 36 Tage p.ins., gefolgt von einer Challenge-Infektion mit dem Feldisolat „11722-WILL“ 34 Tage später. Zur gleichen Zeit wurden zwei tragende Kontrollsaunen infiziert.

Am Tag der Challenge hatten alle vakzinierten Sauen neutralisierende Antikörper ausgebildet. Nach der Infektion wurden weder Aborte noch andere Störungen der Trächtigkeit festgestellt. Keine der vakziniert-infizierten Sauen zeigte p.i. eine Virämie oder Virusausscheidung. Die Ferkel der beiden mit Koslov-Virus infizierten Sauen waren virologisch negativ, getestet im Blut vor der ersten Kolostrumaufnahme. Alle von den vakzinierten Sauen des zweiten Experimentes gewonnenen Feten waren virologisch negativ (Organe, Blut), wie die Sauen selbst auch. Im Gegensatz dazu waren die Feten der Kontrollen KSPV-positiv. Die Sauen entwickelten p.i. Antikörper und wurden zum Zeitpunkt der Hysterektomie virologisch mit negativem Ergebnis untersucht. Die Experimente zeigen, dass oral mit C-Stamm-Vakzine immunisierte Sauen nach Infektion kein KSPV diaplazentar übertragen.

Entwicklung neuer Köder für die orale Immunisierung von Wildschweinen gegen Klassische Schweinepest (KSP)

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

Die Feldversuche zur oralen Immunisierung der Wildschweine gegen Klassische Schweinepest hatten gezeigt, dass die Immunisierung ein zusätzliches Mittel zur KSP-Bekämpfung beim Schwarzwild sein kann, jedoch der Anteil seropositiver Frischlinge nicht ausreichend hoch war. Mit einem verbesserten Immunisierungsverfahren, welches drei Doppelimmunisierungen im Jahr beinhaltet, konnte ein höherer Anteil seropositiver Frischlinge erzielt werden. Die Seroprävalenzraten lagen jedoch auch bei diesem Vakzinationsmodell unter denen bei älteren Wildschweinen. Deshalb wurde eine neue, kleinere Köderform entwickelt, die eine andere Vakzinekapsel erforderte. Letztere bedingt, dass der Impfstoff in lyophilisierter Form konvektioniert werden muss. Ausgehend davon wurden Untersuchungen zur Stabilität von C-Vakzine unter verschiedenen Umweltbedingungen (Temperaturen) durchgeführt und lyophilisierter Impfstoff im Tierexperiment auf seine Wirksamkeit überprüft. Es zeigte sich, dass lyophilisierter Impfstoff stabiler war als flüssiger Impfstoff, wenngleich bei höherer Temperatur (37 °C) der Virustiter innerhalb von vier Tagen signifikant abfiel. Erste Immunisierungsversuche haben gezeigt, dass ein effektiver Schutz, vergleichbar dem nach Applikation der gegenwärtigen flüssigen C-Stammvakzine (Riemser Schweinepestvakzine) erzielt wurde. Stabilitätsuntersuchungen mit einer modifizierten KSP-Lebendvakzine (CP7_E2alf) erbrachten *in vitro* ähnliche Resultate wie mit lyophilisierter C-Vakzine.

Überprüfung des kolostralen Schutzes gegenüber einer KSPV-Infektion bei Frischlingen zwei Monate post natum

Lange, E., Teuffert, J., Müller, Th., Klopffleisch, R., Teifke, J.P. und Kaden, V.*

Etwas mehr als zwei Monate nach der Geburt wurden drei Frischlinge, die von einer oral vakzinierten Bache abstammten, mit einem Feldvirus (Isolat vom Schwarzwild) intranasal infiziert. Die zum Zeitpunkt der Infektion vorhandenen Antikörpertiter lagen zwischen 100 und 200 ND₅₀. Nach Infektion überlebten alle Tiere, wobei ein Wildschwein kurzzeitig geringgradige Inappetenz zeigte. Keines der Tiere hatte jedoch eine Virämie oder schied Virus aus. 35 Tage p.i. wurden die Tiere getötet. Die Frischlinge zeigten zu dem Zeitpunkt weder pathologisch-anatomische Veränderungen noch konnte KSPV bzw. virale RNA in Blut und Organen nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass diese Tiere keine Virusträger blieben.

Zur Rolle der transplazentären Infektion mit KSPV für das Perpetuieren der Seuche im Schwarzwildbestand

Kaden, V.*

(in Zusammenarbeit mit Schnabel, J. und Bruer, W. [Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Nordvorpommern, Grimmen] und Steyer, H. [Riemser Arzneimittel AG])

Aus einem endemisch mit KSPV infizierten Gebiet (LK Nordvorpommern, Mecklenburg-Vorpommern) wurden 34 tragende Bachen und ihre Feten bzw. Embryos auf das Vorhandensein von KSPV bzw. Antikörpern untersucht. Zwanzig der 34 Bachen waren serologisch positiv. Bei keiner der untersuchten Sauen und deren Nachkommenschaft konnte KSPV oder Virusgenom in den Organen festgestellt werden. Dieses Untersuchungsergebnis in einem endemisch infizierten Gebiet impliziert, dass aus einer transplazentären Infektion hervorgegangene Frischlinge keine entscheidende Rolle für die Perpetuierung der Infektion im Schwarzwildbestand spielen sollten. Andere Faktoren scheinen dafür eine wichtigere Rolle zu spielen.

Epidemiologische Analysen zum Wiederauftreten der Schweinepest in einem ehemals beimpften Gebiet in Nordrhein-Westfalen

Teuffert, J.*, Staubach, C. und Conraths, F.J.

Im Landkreis Euskirchen, dem Ursprungsgebiet des vom 22.04. bis 14.10.2002 in insgesamt drei Landkreisen des Bundeslandes Nordrhein-Westfalen aufgetretenen Schweinepestgeschehens bei Wildschweinen, wurde am 07.10.2005 erneut die Schweinepest bei Wildschweinen festgestellt. Dem vorangegangen war die vermeintlich erfolgreiche Bekämpfung dieser Tierseuche unter Einbeziehung der oralen Immunisierung. Vom August 2002 bis zum Frühjahr 2004 erfolgte die Beköderung mit der Riemser Schweinepest-Oralvakzine. Die Bekämpfungsmaßnahmen schlossen bis Ende 2004 virologische und serologische Überwachungsuntersuchungen aller erlegten und verendeten Wildschweine ein. Anhand der für Wildschweine geführten Datenbank analysierten wir allein für den Landkreis Euskirchen im Zeitraum 01.01.2003 – 31.12.2004, dass 5.362 Wildschweine in der Virusanzucht mit negativem Ergebnis für KSPV untersucht wurden. Im gleichen Zeitraum wiesen 38,1 % der untersuchten Frischlinge, 57,4 % der Überläufer und 64,6 % der Adulten Antikörper für Schweinepest auf. Der Anteil der insgesamt untersuchten Wildschweine betrug bei den Frischlingen 57,3 %, bei den Überläufern 27,7 %, bei den Adulten 11,6 % sowie bei den Tieren ohne Altersangabe 3,4 % und entsprach somit den Vorgaben.

Die Ergebnisse der Überwachungsuntersuchungen und der Tatbestand, dass am 14.10.2002 zunächst die letzte Seuchenfeststellung bei Wildschweinen in diesem Bundesland erfolgte, veranlasste den Ständigen Ausschuss für die Lebensmittelkette und die Tiergesundheit im September 2004 zur Änderung der Entscheidung 2003/526/EG dahingehend, dass die Handelsbeschränkungen für Nordrhein-Westfalen aufgehoben wurden. Darüber hinaus stimmte er am 07.12.2004 der Beendigung der Bekämpfungsmaßnahmen in Nordrhein-Westfalen zu.

Seit dem 01.01.2005 sank die Dichte der Überwachungsuntersuchungen. Dennoch wurden im Kreis Euskirchen bis zum 06.10.2005 457 Wildschweine virologisch mit KSPV-negativem Ergebnis und 897 Wildschweine serologisch untersucht. Infolge der Aussetzung der oralen Immunisierung im Frühjahr 2004

fiel folgerichtig die KSP-Antikörperprävalenz bei den Frischlingen auf 7,6 %, bei den Überläufern auf 29,7 % und bei den Adulten auf 54,2 % ab.

Die erneute Seuchenfeststellung bei einem Frischling vom 07.10.2005 in der Gemeinde Bad Münster-Eifel, Landkreis Euskirchen, begründet sich nicht auf Hinweisen aus Überwachungsuntersuchungen, sondern auf klinischen Auffälligkeiten im Verhalten des Frischlings. Damit bestätigt sich die Auffassung, dass verendete, verunfallte bzw. klinisch krank angesprochene Wildschweine für die Früherkennung der Schweinepest besonders wertvoll sind. Bezüglich der Frage, ob es sich bei dem erneuten Seuchengeschehen im gleichen Gebiet um einen Neueintrag des Virus in die Wildschweinpopulation oder um einen Residualherd aus 2002 handelt, neigen wir dazu, letzteres anzunehmen. Dies ist insbesondere deshalb der Fall, weil der genetisch nachgewiesene Subtyp 2.3 Rostock exakt dem 2002 nachgewiesenen Subtyp entspricht. Gegen die vermutete Ursache einer frischen Infektion spricht weiterhin, dass der Subtyp 2.3 Rostock seit März 2003 in Deutschland weder bei Haus- noch bei Wildschweinen vorgekommen ist.

Dass es zum Wiederauftreten der Schweinepest in ehemals KSP-infizierten und danach freigegebenen Gebieten kommen kann, ist unabhängig davon, ob die Bekämpfung mit oder ohne Einschluss der oralen Immunisierung erfolgt. Noch so intensive Überwachungsuntersuchungen scheinen in Einzelfällen das Auftreten von Residualherden nicht verhindern zu können. Insofern gilt es, das Stichprobenprogramm, insbesondere dessen Dauer und Intensität, immer wieder zu überprüfen. Treten Residualherde auf, müssen sie schnell und umfassend bekämpft werden. Dazu stellten wir den in die Bekämpfung involvierten Behörden (Kreis, Regierungsbezirk) aktuelle Auswertungen aus der Schweinepestdatenbank zur Verfügung. Unter Verweis auf § 14 b der Schweinepestverordnung vom 20.12.2005, nachdem das Impfgebiet nicht größer als der Wildschweinepest-gefährdete Bezirk sein darf, wurde empfohlen, diesen von vornherein ausreichend groß anzulegen. Diese Empfehlung fand anfangs keine ausreichende Berücksichtigung. Die Folge war ein virologisch positiver Fall außerhalb des Impfgebietes, der eine Erweiterung des gefährdeten Bezirkes nach sich zog.

Epidemiologie und Bekämpfung der Klassischen Schweinepest (KSP) bei Wildschweinen und die potentielle Nutzung einer neu entwickelten Lebendmarkervakzine, Teil 1: Epidemiologie

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: CSF VACCINE & WILD BOAR, werden im Teil Epidemiologie des Projektes wissenschaftliche 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.

Bedeutung der Genotypisierung für die Epidemiologie der Klassischen Schweinepest (KSP)

Depner, K.R.*, Strebelow, H.-G., Staubach, Ch., Kramer, M., Teuffert, J., Hoffmann, B. und Beer, M.

(in Zusammenarbeit mit Bötcher, L. [LAVES, Veterinärinstitut Oldenburg] und Greiser-Wilke, I. [Institut für Virologie der TiHo Hannover])

In Deutschland wurden im Jahre 2002 elf Ausbrüche von Klassischer Schweinepest (KSP) registriert. Sie traten ausschließlich in Regionen auf, in denen das KSP-Virus in der Wildschweinpopulation zirkulierte. In zehn Fällen zeigte die phylogenetische Analyse, dass die Isolate der Hausschweine und der Wildschweine identische Sequenzen in der 5' nicht-translatierten Region (5'NTR) hatten. In einem Fall wurde jedoch ein Isolat gewonnen, das sich vom dort zirkulierenden Wildschweinisolat leicht unterschied. Dies war ein unerwartetes Ergebnis, da alle anderen Befunde auf eine Viruseinschleppung vom Wildschwein

hindeuteten. Das Hausschweinisolat 2.3 Rotenburg unterschied sich im 5'NTR nur durch ein Nukleotid vom Wildschweinisolat 2.3 Uelzen. Bei der Analyse des E2-Fragments wurden Verwandtschaften zu 100 % bzw. 98 % mit zwei älteren Isolaten aus Niedersachsen und Sachsen-Anhalt festgestellt. Somit könnte 2.3 Rotenburg ein Nachkomme von 2.3 Uelzen oder auch ein völlig neu in die Region eingeführtes Virus sein. Eine Mutation von 2.3 Uelzen zu 2.3 Rotenburg hätte theoretisch entweder in der Wildschweinpopulation oder in den Hausschweinen stattfinden können. Alle epidemiologisch relevanten Daten deuteten auf eine Viruseinschleppung aus der Wildschweinpopulation hin. Aufgrund der serologischen Ergebnisse im Neutralisationstest wurde geschlussfolgert, dass 2.3 Uelzen in die Schweinefarm eingeschleppt wurde und es dann anschließend zu der Mutation gekommen ist.

Immunantwort von Schweinen gegen das Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) nach Vakzinierung mit einer Parapoxvektor-Vakzine und anschließender Belastungsinfektion

Voigt, H., Saalmüller, A., Marquardt, C., Pfaff, E.*, Wienhold, D. und Büttner, M.

(in Zusammenarbeit mit Le Potier, M.F., Merant-Kokoglu, C. [AFSSA, Ploufragan, Swine Immunology and Virology Unit, Ploufragan, Frankreich])

Vakzinierungen mit Markervakzinen gegen klassische Schweinepest (KSP) ist die Methode der Wahl für Notfallimpfungen von Schweinen bei Gefahr einer Ausbreitung von klassischer Schweinepest in der Europäischen Union. Wir haben einen neuen Impfstoff basierend auf einem viralen Vektor (Parapoxvirus, PPV), welcher die E2 Untereinheit des KSPV exprimiert, entwickelt und sein immunogenes Potential in Schweinen getestet. Die Anwendung der rekombinanten Vektorvakzine im Schwein erwies sich als sicher. Die Induktion von Typ I Interferonen im porzinen System durch das rekombinante Virus konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Die Bildung neutralisierender Antikörper und die Sekretion von Gamma-Interferon (IFN-Gamma) wurden sowohl an verschiedenen Zeitpunkten nach einer einmaligen bzw. zweimaligen Injektion als auch nach einer letalen Belastungsinfektion untersucht. Die virale Vektorvakzine induziert einen guten Schutz bereits nach einer einzelnen intramuskulären Injektion. Das Auftreten geringer Titer KSPV neutralisierender Serumantikörper vor der Belastungsinfektion korreliert gut mit dem Impfschutz. Zusätzlich zeigte eine signifikante Zahl von Virus-spezifischen IFN-Gamma produzierenden Zellen nach *In-vitro*-Stimulation von PBMC den Schutz an. Auch konnte eine Virusausbreitung, welche unter Einbeziehung nicht geimpfter Tiere analysiert wurde, nicht gefunden werden. Eine "multi-site" – Anwendung der Vektorvakzine zeigte sich der klassischen Applikation an nur einer Stelle überlegen.

Analyse der Immunantwort des Schweines nach KSPV Vakzinierung gegen das Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) mit dem Nicht-Strukturprotein-3 (NS3)

Voigt, H., Pfaff, E.*, Wienhold, D. und Büttner, M.

Für den Fall des Ausbruches der klassischen Schweinepest (KSPV) in vormals virusfreien Gebieten ist in der EU eine Interventionsimpfung möglichst mit Markerimpfstoffen vorgesehen. Da die bisherigen Impfstoffe auf Basis des Glykoproteins E2 keinen umfassenden Immunschutz vermitteln, wurde die Immunogenität einer NS3 Subunitvakzine untersucht. Hierzu wurde das NS3-Gen des CSFV Stammes Glentorf isoliert, bakteriell exprimiert und nach einer Reinigung zur Immunisierung von Schweinen verwendet. Als Zeichen für die Induktion zellvermittelter Immunmechanismen konnten IFN-gamma sezernierende Zellen im Blut der Impflinge nachgewiesen werden. Überdies enthielten die Seren der immunisierten Tiere KSPV-NS3-spezifische Antikörper, die jedoch keine neutralisierende Funktion aufwiesen. Trotz der induzierten Immunantwort konnte der Verlauf einer letalen Belastungsinfektion nicht entscheidend beeinflusst werden. An diesem Beispiel zeigt sich nochmals die herausragende Bedeutung neutralisierender Antikörper für die Kontrolle einer KSPV Infektion.

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 von persistent infizierten Kälbern 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.

Studien zur Replikation von cp und ncp BVDV Stämmen in MDBK-Zellen

Granzow, H.* und Beer, M.

Vertreter des Genus Pestivirus lassen sich elektronenmikroskopisch in Ultradünnschnitten infizierter Zellen nur sehr schwer nachweisen. Dies betrifft vor allem BVDV und KSPV. So herrscht über die Bildungsweise dieser Pestiviren in Zellkulturen morphologisch noch immer weitgehend Unklarheit. In ersten Untersuchungen wurden verschiedene Zellkulturen mit cp BVDV und ncp BVDV infiziert und parallel dazu mit Fluoreszenztests versucht, eine geeignete Zellkultur für gezielte Infektionsversuche zu finden.

Für weitere umfangreiche ultrastrukturelle Untersuchungen wurden dann ausschließlich MDBK-Zellen infiziert, zwischen 24 und 96 Stunden p.i. als Monolayer fixiert und in Epoxidharz eingebettet.

Erste deutliche morphologische Veränderungen in der Zellstruktur traten bereits 24 Stunden p.i., unabhängig vom verwendeten Virusstamm, auf. Diese betrafen vor allem die Zunahme von lysosomalen Strukturen. Der Golgi-Apparat und Zisternen des RER zeigten bis 36 Stunden p.i. keine sichtbaren Veränderungen. Partikel in Lysosomen wiesen Ähnlichkeiten zu an der Zelloberfläche nachweisbaren Viruspartikeln auf. Möglicherweise handelt es sich hier um erste zelluläre Abwehrreaktionen gegenüber dieser Virusinfektion. Zu späteren Zeitpunkten p.i. nahm die Zahl an der Zelloberfläche aggregierter Viruspartikel deutlich zu. Budding-Prozesse ließen sich nicht finden. Immunocytochemische Experimente sollen in weiteren Untersuchungen die Orte der Virusmorphogenese näher charakterisieren helfen.

Charakterisierung von attenuierenden Mutationen und viralen Virulenzfaktoren

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

BVDV Lebendvakzinen haben 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 des Strukturglykoproteins E^{ms} bzw. zur weitgehenden Deletion der Sequenz, die für das virale Nichtstrukturprotein N^{pro} kodiert. N^{pro} ist eine Protease und interferiert mit der angeborenen Immunantwort von Zellen gegen eine virale Infektion. Nach Infektion von trächtigen Rindern konnte gezeigt werden, dass weder eine RNase inaktivierende Mutation noch eine Deletion des N^{pro} in der Lage sind, den diaplazentaren Transfer der Viren und die Etablierung persistenter Infektion zu verhindern. Damit stellen beide Typen von Mutanten keine idealen Ausgangspunkte für die Entwicklung verbesserter BVDV Lebendvakzinen dar. Weitere Mutanten werden z.Zt. auf ihre Eignung als sichere Vakzineviren getestet. Parallel dazu wird daran gearbeitet, Möglichkeiten zur Markierung von BVDV zu schaffen, die es erlauben sollen, geimpfte Tiere von solchen Tieren zu unterscheiden, die eine Feldvirusinfektion durchgemacht haben.

Die RNase Funktion des Strukturglykoproteins E^{ms} stellt einen Virulenzfaktor von Pestiviren dar. Sie ist nicht essentiell für die Virusvermehrung in Gewebekulturzellen, 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 und sollen ausgehend von einer detaillierten molekularen Charakterisierung des E^{ms} Proteins untersucht werden. Eine besondere Eigenschaft des E^{ms} ist, dass es keinen klassischen Membrananker besitzt. Bisher war nicht bekannt, wie

das Protein am Viruspartikel verankert ist. In kürzlich veröffentlichten Arbeiten konnten wir zeigen, dass E^{rns} über einen neuartigen Membrananker an zelluläre Membranen gebunden ist. Die dafür verantwortliche Sequenz ist im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert und wird z.Zt. biochemisch genauer charakterisiert. Neben dem Mechanismus der Membranverankerung wird in zukünftigen Arbeiten vor allem die biologische Funktion dieser ungewöhnlichen Sequenz und ihre mögliche Verbindung mit der Rolle des Proteins als Virulenzfaktor untersucht werden.

Untersuchungen zur Replikation, Verpackung und Genexpression von BVDV-Replikons

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

Autonom replizierende BVDV-Replikons mit Deletionen in dem für die Strukturproteine kodierenden Genombereich (ΔC , $\Delta E1$, ΔE^{rns} , $\Delta E2$) wurden konstruiert, die im 3'-nicht-translatierten Bereich ihres Genoms eine Insertion der EMCV-IRES sowie des EGFP- bzw. des DsRED-Gens enthielten. Für alle bicistronischen Replikons konnte in bovinen Zellen die Replikationsfähigkeit und die Expression der BVDV-Proteine sowie der entsprechenden Markerproteine gezeigt werden. In weiteren Untersuchungen wird die Möglichkeit der gegenseitigen *trans*-Komplementierung nach Transfektion von Replikon-RNA geprüft und analysiert. Mittels bicistronischer BVDV-Genome (cp7), die ebenfalls Insertionen der EMCV-IRES sowie des EGFP- bzw. des DsRED-Gens enthalten, gelang es EGFP bzw. DsRED exprimierende BVDV-Viren zu isolieren, die sich im Wachstumsverhalten nicht vom parentalen BVDV-cp7 unterschieden. Im Weiteren sollen die bicistronischen BVDV-Replikons und die Markerprotein-exprimierenden BVDV zur Charakterisierung der RNA-Replikation, Genexpression, Interferenz und Verpackung der Pestiviren genutzt werden.

Charakterisierung von konservierten Genomsequenzen im Glykoprotein E2 des BVDV

Reimann, I.* und Beer, M.

Innerhalb des Glykoproteins E2 der Pestiviren befinden sich zwei hochgradig konservierte Regionen, für die eine wichtige Funktion bei der Infektion von Zellen mit Pestiviren vermutet wird. Dazu gehört einerseits ein Abschnitt, der als mögliches Fusionspeptid in Frage kommt, sowie ein Disulfid-Isomerase-Motiv (CXXC). Mit Hilfe von Mutageneseverfahren wurden beide Regionen innerhalb der gesamten cDNA-Sequenz eines infektiösen BVDV Klon durch die Substitution oder Deletion von einzelnen oder mehreren Aminosäuren verändert.

Hierbei zeigte sich, dass eine Deletion oder Substitution des zentralen und hoch konservierten Glycins an Position 828 innerhalb des möglichen Fusionspeptides ebenso wie kleine Veränderungen innerhalb des CXXC Motivs (CEWC zu CEAC) zu Genomen führten, die zwar noch zur RNA-Replikation, aber nicht mehr zur Bildung infektiöser Virionen befähigt waren (Replikons). Wurden Austausch mit der Region, die für den carboxy-terminalen Teil des TBEV Fusionspeptides kodiert, vorgenommen, entstanden Sequenzen, aus denen infektiöse Virionen generiert werden konnten. Allerdings wurden dann Reversionen beobachtet, wobei ein zusätzliches Serin des TBEV Teiles deletiert war. Wurde innerhalb des CXXC-Motives eine aromatische Aminosäure gegen eine ähnliche ausgetauscht, so konnten ebenfalls infektiöse Virionen generiert werden. Interessanterweise waren Mutanten mit Austausch, die für den aminoterminalen Abschnitt oder für das komplette TBEV Fusionspeptid kodierten, nur Replikons. Zahlreiche Analysen mittels RT *real time* PCR zeigten zudem für die nicht infektiösen Mutanten, dass keine Ausschleusung von Virus-RNA und damit vermutlich kein viraler *egress* möglich war. Die genannten konservierten Bereiche des BVDV E2 spielen somit offensichtlich eine zentrale Rolle nicht nur für die Infektion, sondern auch für die Bildung und/oder Ausschleusung infektiöser Virionen. Alle Konstrukte wurden allerdings effizient in infektiöse Pseudoviren verpackt, wenn die entsprechenden RNAs in eine Helferzelle, die alle Strukturproteine des BVDV exprimiert, transfiziert wurden.

Neue BVDV Lebend-Impfstoffe

Reimann, I., König, P., Semmler, I. und Beer, M.*

Sowohl verpackte Replikons (Pseudoviren) als auch replikative Deletionsmutanten des BVDV wurden konstruiert und *in vitro* wie auch *in vivo* charakterisiert. Während für die Herstellung von Pseudoviren

Helferzellen benötigt werden, konnten ausgewählte BVDV-Deletionsmutanten auf bovinen Zellkulturen (MDKB, KOP-R) mit Titern von bis zu 10^6 KID₅₀ produziert werden. Es konnten sowohl zytopathogene als auch nicht-zytopathogene Viren und Pseudoviren vermehrt werden. Im Rahmen von Infektionsexperimenten mit Rindern konnte gezeigt werden, dass nach der zweimaligen Applikation von BVDV-Pseudoviren ein vollständiger Schutz gegen eine BVDV Testinfektion gegeben war. Im Gegensatz hierzu mussten die replikativen Deletionsmutanten des BVDV nur einmalig appliziert werden, um 28 Tage nach Immunisierung eine sterile Immunität zu erreichen.

1.5 RHABDOVIREN

1.5.1 Tollwut-Virus

Tollwutgeschehen in Deutschland 2005

Müller, T.*, Selhorst, T., Geue, L., Ulrich, R., Conraths, F.J. und Pöttsch, C.J.

Die Existenz eines Tollwut-Residualherdes in den suburbanen bzw. urbanen Gebieten Südhessens führte neben Baden-Württemberg auch Anfang 2005 erstmals seit 1998 zu einer Reinfektion benachbarter Gebiete in Rheinland-Pfalz. Die Situation zwang die Veterinärbehörden noch im November 2004, zwei Jahre nach Beendigung der oralen Immunisierung, zur Re-Etablierung eines präventiven Impfkordons entlang der gemeinsamen Grenze zu Hessen. Diese Erstimpfung konnte die erforderliche Immunisierungsrate nicht erreichen und die massive und schnelle Ausbreitung der Tollwut in westliche Richtung nicht verhindern. So wurden bis Ende April 2005 insgesamt 31 Tollwutfälle in Hessen, Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz verzeichnet. Diese Notsituation sowie internationaler Druck seitens der Nachbarländer sowie der EU zwangen das NRL für Tollwut am FLI, sich 2005 fast ausschließlich der Tollwutbekämpfung in Deutschland zu widmen. In verstärkter Zusammenarbeit mit den Ländern, dem Bund sowie anderen beteiligten Institutionen wurde eine Reihe von Sofortmaßnahmen ergriffen, die auf eine einheitliche Impfstrategie der oralen Immunisierung in den betreffenden Bundesländern zielten. Neben der strikten Anwendung der EU Empfehlungen wurden weitere korrigierende Maßnahmen ergriffen:

- zentrale Planung und Durchführung der Impfkampagnen unter stärkerer Einbindung des NRL
- epidemiologische Analyse der Tollwutsituation und Identifizierung von Risikogebieten
- drastische Erweiterung der Impfgebiete, insbesondere in Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg, zur Verhinderung einer weiteren Ausbreitung,
- erhöhte Anzahl von Impfkampagnen in Hochrisikogebieten (sechs Wochen Intervall),
- strikte komplementäre Handauslage in Siedlungsgebieten,
- Intensivierung der Surveillance über die geforderte Stichprobe von acht Füchsen/km² und Jahr sowie eine konsequente Begleitdiagnostik zur OIF,
- Auswertung der Flugzeugbeköderung sowie der Impfkampagnen durch das NRL
- halbjährliche Arbeitstreffen zwischen Bund, NRL und den Ländern zur Koordinierung der Impfkampagnen

Die Ergreifung dieser Sofortmaßnahmen konnte die weitere Ausbreitung der Tollwut verhindern und führte darüber hinaus zu einem Rückgang der Tollwut im zweiten Halbjahr 2005. Bis Ende 2005 wurden insgesamt 42 Tollwutfälle verzeichnet. Grundlage für die Planung der Impfkampagnen in den betreffenden Regionen sowie der dadurch im zweiten Halbjahr erzielten Fortschritte war die Nutzung eines Modells zur prognostischen Bestimmung potentieller Risikogebiete.

Die Simulation zweier Impfstrategien für eine Notimpfung ergab, dass für das praktische Notfallmanagement im Falle einer Reinfektion bereits tollwutfreier Gebiete eine Ringimpfung um den Neuausbruch keine günstige Strategie darstellt. Selbst bei geringsten Ressourcen besteht die Gefahr des Auftretens von Tollwutfällen außerhalb des Impfgebietes. Dem gegenüber ist eine flächendeckende Kreisimpfung wesentlich vorteilhafter.

Die in Europa zugelassenen Tollwutlebendimpfstoffe für die orale Immunisierung sind so genannte SAD (Street Alabama Dufferin)-Derivate. Sie sind demzufolge sehr eng miteinander verwandt und weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie auf. Bisläng sind die Impfstämme jedoch genetisch nicht ausreichend voneinander unterscheidbar. In 2005 wurde deshalb das Virusgenom von vier attenuierten Tollwutlebendimpfstoffen (SAD B19, SAD P5/88, SAG2, SAD VA1) komplett sequenziert. SAD P5/88 sowie SAG2 unterscheiden sich von SAD B19 im gesamten Virusgenom in nur sechs bzw. vier Mutationen, die

zu jeweils drei bzw. zwei Aminosäureaustauschen führen. Ein in Deutschland zugelassener Impfstoff mit der Bezeichnung SAD VA1 wies insgesamt 38 Mutationen auf, die zu 17 Aminosäureaustauschen im Gegensatz zu den Sequenzen aller anderen Impfstämme sowie des originalen SAD VA1-Stammes führen. Demzufolge handelt es sich definitiv nicht um einen SAD VA1-Impfstamm. Die Herkunft dieses Impfstammes ist ungeklärt. Zwei weitere SAD Impfstoffe sind in Bearbeitung.

Wie in 2003 und 2004 wurde ein weiterer SAD-Nachweis bei einem Fuchs in Rheinland-Pfalz durch das FLI geführt und bestätigt. Die komplette Sequenzierung von vier SAD-Virusisolaten ergab eine fast 100%ige Sequenzhomologie mit den in den jeweiligen Impfgebieten ausgelegten Impfstoffen. Bei drei der vier SAD-Virusisolate wurden bis zu vier zusätzliche Mutationen im Polymerase-Gen (L-Gen) identifiziert, die vermutlich zu keiner Änderung der Pathogenität führen, wie auch experimentelle Studien zeigten. 2005 wurden weitere experimentelle Untersuchungen zur Pathogenität von Europäischen Fledermausviren (EBLV) an Fledermäusen durchgeführt. Dazu wurden nordamerikanische Verwandte der Breitflügelfledermaus verwendet. Drei Gruppen mit jeweils sieben Fledermäusen (*Eptesicus fuscus*) wurden intrazerebral (i.c.), peroral (p.o.), und intranasal (i.n.) mit EBLV-1 ($10^{4,9}$ MLD/ml) infiziert. Zwei Gruppen wurden intramuskulär (i.m.) mit einer hohen ($10^{4,9}$ MLD/ml) bzw. niedrigeren Dosis ($10^{3,9}$ MLD/ml) inokuliert. Jeweils vier (i.c.), zwei (i.m. hohe Dosis) und drei (i.m. niedrige Dosis) starben innerhalb von zwei Monaten post infectionem. Alle übrigen Tiere überlebten einen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. Nur zwei der infizierten Tiere entwickelten neutralisierende Antikörper. Die experimentellen Studien werden mit EBLV-2 fortgeführt.

Das natürliche Infektionsgeschehen an einer frei lebenden Breitflügelfledermauskolonie mit einer Stärke von ca. 25-35 Tieren wurde weiter verfolgt. In 2005, dem 4. Jahr der Langzeitstudie, wurden wiederum zwei Tiere mit hohen virusneutralisierenden Antikörpern ($> 1:80$) gegen EBLV-1 gefunden. Drei Tiere waren im Speichel PCR positiv. Während sämtliche Tiere zu Beginn der Studie sowohl serologisch als auch virologisch negativ waren, scheint sich in den letzten zwei Jahren eine EBLV-1 Infektion etabliert zu haben. Die experimentellen und Feldstudien geben Hinweise auf den Infektionsablauf bei einheimischen Fledermäusen.

Ermittlung von Risikogebieten bei der Bekämpfung der Fuchstollwut

Selhorst, T.*, Müller, T., Conraths, F.J. und Staubach, C.

Im Jahr 2005 wurde die Fuchstollwut nach Rheinland-Pfalz eingeschleppt. Insgesamt wurden 33 Fälle festgestellt, davon 31 Fälle beim Fuchs. Der Eintrag erfolgte wahrscheinlich durch Tollwut-infizierte Tiere aus Hessen.

Um die Impfkampagnen gegen Tollwut optimal gestalten zu können, erfolgte ein verstärkter Einsatz von geografischen Informationssystemen. In das System flossen alle verwertbaren Informationen ein, die im Rahmen der Impfkampagnen anfielen. Insbesondere konnten erstmalig die Abwurfpositionen der Köder, die mit Flugzeugen ausgebracht werden, geografisch verarbeitet werden. Diese geografische Verarbeitung diente dem Ziel zu überprüfen, ob eine flächendeckende Köderausbringung gewährleistet werden kann, die für den Erfolg von Impfmaßnahmen bedeutsam ist. Die genaue Erfassung der Köderabwurfpositionen ermöglicht sowohl eine Überprüfung der vorgegebenen Fluglinienabstände als auch die Ermittlung der Anzahl Köder, die pro Quadratkilometer abgeworfen wurden.

Die Analyse der Positionsdaten ergab, dass in weniger dicht besiedelten Gebieten die geforderte Köderdichte [Köder pro km^2] eingehalten wurde. Im Gegensatz hierzu kann die geforderte Köderdichte aus technischen Gründen nicht erzielt werden, da eine Flugauslage von Impfködern über bebauten Gebieten nicht möglich ist. In diesen Gebieten muss eine komplementäre Handauslage durchgeführt werden, um das Ziel einer flächendeckenden Beköderung zu erreichen.

Informationen über Größe und Lage von Gebieten, in denen eine Handauslage durchgeführt wurde, sind weitaus schwieriger zu erhalten. Bei fehlender Information musste davon ausgegangen werden, dass keine komplementäre Handauslage durchgeführt wurde (worst case).

Die weitere Analyse der Köderabwurfpositionen und der Handauslagegebiete erfolgte mit dem Ziel, Flächen ausweisen zu können, in denen die Köderdichte eine Mindestdichte nicht erreichte. Diese Flächen stellen Risikogebiete für eine Infektion mit Tollwut dar, weil davon ausgegangen werden muss, dass eine Köderdichte, die unterhalb eines definierten Schwellenwertes liegt, in einen mangelnden Immunschutz mündet. Da jedoch isoliert liegende Kleinflächen von 1 km^2 kein Risiko darstellen können, wurde um die Zellen ein Puffer gelegt, damit Zellverbände entstehen können, die durchaus ein Risiko hinsichtlich des Schutzes vor einer Infektion mit Tollwut darstellen können.

Die Arbeiten zur Bestimmung von Risikogebieten waren Mitte 2005 abgeschlossen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden in Rheinland-Pfalz 26 Tollwutfälle amtlich festgestellt. Interessanterweise traten die folgenden Tollwutfälle zum Großteil in den vorher ausgewiesenen Risikogebieten auf.

Durch den Einsatz eines geografischen Informationssystems kann somit die Bekämpfung einer Zoonose wesentlich unterstützt werden, indem das Augenmerk auf solche Gebiete gelenkt wird, in denen besondere Maßnahmen erforderlich sind. Die Bekämpfung der Fuchstollwut kann in Zukunft noch weiter verbessert werden, indem insbesondere der Zufluss von Informationen über die durchgeführten Handlungen verbessert wird.

Orale Immunisierung von Jungfüchsen im Sommer

Selhorst, T.*, Staubach, C. und Müller, T.

Die orale Immunisierung von Füchsen gegen Tollwut ist das Mittel der Wahl bei der Bekämpfung dieser Infektionskrankheit bei Wildtieren. Die Vergangenheit zeigt, dass die Methode als einzige erfolgreich ist. Sie ist aber auch kostenintensiv. Auf den Kostenaspekt zielen Untersuchungen zur Möglichkeit der Immunisierung von Jungfüchsen im Sommer ab.

Bei zweimaliger Impfung der Fuchspopulation im Frühjahr und Herbst deutete sich eine unzureichende Immunisierungslage bei Jungfüchsen an. Diese ergibt sich vermutlich dadurch, dass Jungfüchse nach einer Frühjahrsauslage kaum Impfköder aufnehmen. Falls die Jungtiere Köder aufnehmen, können maternale Antikörper die Ausbildung eines Impfstoff-induzierten Schutzes verhindern. Um dennoch einen Impfschutz bei Jungfüchsen zu erreichen, wurde von mehreren Autoren vorgeschlagen, zusätzlich zur Frühjahrs- und Herbstauslage im Sommer ebenfalls Impfköder auszubringen. Diese zusätzliche Auslage ist mit erheblichen Mehrkosten verbunden. Der zusätzliche Nutzen kann geringer als erwartet ausfallen, weil Jungfüchse im Sommer im Vergleich zum Muttertier ein kleines Streifgebiet haben. An diese kleinen Streifgebiete ist die Flugauslage hinsichtlich der Fluglinienabstände nicht angepasst. Daher wird vermutet, dass die durch Flugzeuge ausgebrachten Köder Jungfüchse nicht erreichen. Ein Ausgleich dieses Mangels kann durch eine Handauslage nicht erreicht werden.

Die vorstehenden Ausführungen stellen Überlegungen zu diesem Themenkomplex dar, die unter Freilandbedingungen nur schwer zu überprüfen sind. Um Hinweise auf die tatsächlichen Verhältnisse im Feld zu erhalten, wurden zwei Simulationsexperimente durchgeführt. Im ersten Experiment wurden virtuell Köder auf einer Fläche verteilt, wobei ein bestimmter Fluglinienabstand und eine bestimmte Köderdichte pro km² nachgebildet wurden. Jede Position, an der sich ein Köder befindet, ist bekannt. Nun wurden Jungfuchshabitate (konvexe Polygone), deren Größe und Form in Freilanduntersuchungen bestimmt wurden, wiederholt (10.000 mal) zufällig auf der Fläche platziert und die Anzahl Köder, die sich innerhalb des Polygons befinden, bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studien belegen, dass in den wenigsten Fällen Jungfuchshabitate mit einer ausreichend großen Anzahl Köder versorgt werden konnten.

Die in der Realität vorliegende Situation ist durch das Simulationsexperiment nur unzureichend beschrieben, da sich Jungfüchse zusammen mit dem Muttertier ein Territorium teilen. Dabei ist die Aufteilung des Territoriums nicht so, dass das Gesamtterritorium unter den Mitgliedern der Fuchsfamilie so aufgeteilt wird, dass jedes Individuum ein eigenes Territorium hat. Vielmehr überlappen sich die Streifgebiete der Mitglieder mehr oder weniger, wobei das Streifgebiet des Muttertieres die Streifgebiete der Jungtiere einschließt. Daten zur Aufteilung eines Streifgebietes einer Fuchsfamilie, die die Grundlage für eine Teilflächenanalyse darstellen, wurden ebenfalls im Freiland erhoben. Hierbei werden die Flächenanteile bestimmt, die von zwei oder mehreren Familienmitgliedern gemeinsam genutzt werden.

Konkret liegen Informationen über die Größe und Lage der Streifgebiete mehrerer Fähen und deren Nachkommen vor. Im Simulationsexperiment wird nun das Streifgebiet einer Fähe mit den Streifgebieten unterschiedlicher Anzahlen von Nachkommen, die zufällig aus der Gesamtheit der Nachkommen ausgewählt werden, kombiniert, um auf diese Weise Angaben über die Anzahl der für jedes Individuum zur Verfügung stehenden Köder und deren Verteilung zu erhalten.

Herausgabe des Rabies Bulletin Europe (RBE)

Pöttsch, C.J.*

Das RBE wurde 2005 in einer vierteljährlichen Auflagenstärke von 370-400 Exemplaren weltweit versandt. Die nutzerfreundlichere Gestaltung der Internetseite des RBE (www.who-rabies-bulletin.org)

fürte monatlich zu ca. 22.000-60.000 Zugriffen und ca. 1.200-2.500 Besuchen. Schwerpunkt bildete die Entwicklung eines neuen Web-basierten Tollwutinformationssystems für Europa. Das Projekt wird durch die WHO finanziert und im 3. Quartal 2006 fertig gestellt sein.

Weitere Projekte

Empfänglichkeit von Schafen gegenüber EBLV-1 und -2

Müller, T., Lange, E., Vos, A., Fooks, A.R., Brookes, S., Johnson, N., Teifke, J.P., Klopffleisch, R. und Kaden, V.

Retrospektive Untersuchungen zum Vorkommen von EBLV-Infektionen bei einheimischen Fledermäusen

Müller, T.

Komplette Nukleotidsequenzierung von Europäischem Fledermausvirus Typ 1 und 2

Marston, D., Fooks, A.R. und Müller, T.

Komplette Nukleotidsequenzierung von attenuierten SAD-Tollwutimpfstoffen

Geue, L., Müller, T., Ulrich, R., Conraths, F.J. und Vos, A.,

Genotypische Charakterisierung von SAD-assoziierten Tollwutfällen

Geue, L., Müller, T., Ulrich, R., Vos, A. und Fooks, A.R.

Genotypische Charakterisierung von European Bat Lyssavirus Isolaten aus Deutschland

Freuling, C., Müller, T., Geue, L., Conraths, F.J., Fooks, A.R., Johnson, N.

Etablierung einer Real-Time Tollwut-RT-PCR

Müller, T. und Hoffmann, B.

Tollwutsurveillance post vaccinationem und Notfallimpfung

Selhorst, T., Thulke, H.H., Müller, T. und Conraths, F.J.

Afrikanische Wildkarnivoren als Träger des Tollwutvirus ohne Krankheitszeichen

Müller, T., Hofer, H. und East, M.

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.

Entwicklung eines neuen Internet-basierten Tollwutinformationssystems

Schröder, R., Klöß, D., Kliemt, A., Müller, T. und Pöttsch, C.J.

Erhebung und Auswertung von Tollwutdaten aus Europa

Pöttsch, C.J. und Kliemt A.

1.5.2 Rhabdovirus-bedingte Fischkrankheiten: Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN); Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS)

Die Erreger der Infektiösen Hämato-poetischen Nekrose (IHN), der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVC) werden taxonomisch der Familie der *Rhabdoviridae* innerhalb der Ordnung der *Mononegavirales* zugeordnet. Das Genom dieser Erreger besteht aus einer einzelsträngigen RNA negativer Polarität von ca. 11.000 Basen. Insgesamt werden fünf Strukturproteine (Nukleoprotein N, Phosphoprotein P=M1=NS, Matrixprotein M=M2, Glykoprotein G, virales Polymerase-Protein L) von einer gleichen Anzahl monocistronischer mRNAs gebildet. Die Genomorganisation stellt sich wie folgt dar: 3'-N-P-M-G-NV-L-5'. Im Gegensatz zu SVCV (Genus Vesiculovirus) kodieren

IHNV und VHSV (Genus Novorhabdovirus) für ein zusätzliches Gen NV, das in reifen Virionen bislang nicht nachgewiesen werden konnte. Das Molekulargewicht des aus 111 Aminosäuren bestehenden Proteins des IHNV beträgt ca. 13 kDa. Das NV Protein des IHNV ist für eine effiziente Virusreplikation essentiell und stellt einen Pathogenitätsfaktor dar (Thoulouze et al., 2004).

Molekulare Epidemiologie der IHN

Enzmann, P.-J.*, Fichtner, D. und Bergmann, S.M.

Nach Eingruppierung der Europäischen Isolate in den Genotyp M der Nordamerikanischen IHNV-Isolate und der darauf folgenden Etablierung einer Deutschen Datenbank für das IHNV konnte gezeigt werden, dass die Aufspaltung der Deutschen IHN-Stämme bereits viel weiter fortgeschritten ist. Die zwei früher nachgewiesenen Linien (französische und italienische Linie) lassen sich innerhalb Deutschlands bereits in Subtypen unterscheiden. Aus der italienischen Linie lässt sich in Süddeutschland eine Subgruppe ableiten, auf die auch das 1998 aus dem Aal isolierte IHNV zurückzuführen ist. Noch kann allerdings nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass diese Entwicklung in Deutschland stattgefunden hat, oder ob sich hier lediglich die Entwicklung widerspiegelt, die in Südeuropa abläuft. Die Verbreitung des Erregers durch Fischtransporte ist offenkundig.

Molekulare Epidemiologie der VHS

Enzmann, P.-J.*, Fichtner, D. und Bergmann, S.M.

Die überwiegende Mehrzahl der seit 1995 untersuchten Isolate gehört in die so genannte „Südeuropa“-Gruppe, die sich wieder in zwei Untergruppen (SE1 und SE2) verzweigt. Der Handel mit infizierten Fischen erweist sich als der wichtigste Verbreitungsweg. In regionalen kleinen Epizootien entwickeln sich die Virusstämme weiter. Dies konnte in den bereits im Vorjahr nachgewiesenen regionalen VHS-Epizootien in Sachsen und Baden-Württemberg gezeigt werden. Hier konnte eine Mutationsrate von 1-4 Änderungen im Glykoprotein-Gen pro Jahr bei solchen regionalen Ereignissen nachgewiesen werden. Das Virusreservoir lässt sich leider mangels weitergehender Untersuchungen an Wildfischen nicht exakt eingrenzen. Es konnten auch mangelhafte Desinfektionsmaßnahmen als Ursache für die Neuausbrüche im Jahr nach einer Sanierung festgestellt werden.

Virale Hämorrhagische Septikämie Virus (VHSV): Reverses genetisches System

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.

Untersuchungen zur oralen Immunisierung von Forellen gegen VHS

Adelmann, M., Bergmann, S.M., Fischer, U., Köllner, B. und Fichtner, D.*

(in Zusammenarbeit mit Lange, B. [Riemser Arzneimittel AG] und Weitschies, W. [Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald])

Die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) ist die Virusinfektion mit der größten wirtschaftlichen Bedeutung für Forellen-Zuchtbetriebe. Die gezielte Immunprophylaxe ist eine Möglichkeit, Forellen gegen eine Infektion mit VHS-Virus zu schützen.

Seit geraumer Zeit wird versucht, größere Populationen von Forellen mit möglichst geringem Aufwand effektiv zu immunisieren. Die orale Applikation von attenuiertem Virus, eingearbeitet in geeignete Arzneiformen, ist eine mögliche Immunisierungsmethode. Es wurde eine Arzneiform entwickelt, die durch ein neuartiges Prinzip der Freisetzung der Vakzine im Fisch gekennzeichnet ist.

Diese Arzneiform wurde 2005 erstmalig großtechnisch mit einem maschinellen Extruder produziert und ihre Wirksamkeit in einem Tierversuch getestet. Die erhaltenen Ergebnisse früherer Tierversuche konnten verifiziert werden. Es wurden abermals signifikante Schutzraten induziert. Auch Untersuchungen zur Stabilität, *In-vitro*-Freisetzung, Dichtebestimmung und Unschädlichkeit der Präparate wurden durchgeführt.

Mittels RT *real time* PCR durchgeführte immunologische Untersuchungen zeigten, dass durch die Applikation der virushaltigen PEG-Präparate das Immunsystem im Darm und in der Milz stimuliert wurde. Besonders interessant hinsichtlich einer Replikation des Vakzinevirus in den Darmzellen war die Stimulierung des lokalen intestinalen Immunsystems (GALT). Hier konnte auf RNA-Ebene nachgewiesen werden, dass Moleküle des zellulären adaptiven Immunsystems, besonders MHC Klasse II und CD4, verstärkt exprimiert wurden, was möglicherweise zu einer Aktivierung von T-Helferzellen führt.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Arzneiform kann einen wesentlichen Beitrag leisten, Krankheiten wie die VHS in der Aquakultur weiter einzudämmen. Durch die anwenderfreundliche Handhabung, die nachgewiesene Wirksamkeit und die vergleichsweise geringen Herstellungskosten könnte diese Darreichungsform eine interessante Alternative zu bisher praktizierten Immunisierungsmethoden sein. Außerdem bietet diese Arzneiform die Möglichkeit, andere Impfstoffe und auch Arzneistoffe zur Prophylaxe beziehungsweise Therapie von Fischkrankheiten praktikabel einzusetzen.

1.6 PARAMYXOVIREN

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

Das Newcastle Disease Virus (NDV) gehört zum Genus *Avulavirus* in der Familie der *Paramyxoviridae*. Es ist in seiner virulenten Form der Erreger der atypischen Geflügelpest, die zu großen Verlusten beim Wirtschaftsgeflügel führen kann. In Deutschland besteht Impfpflicht für alle Hühner- und Putenbestände. NDV Isolate werden entsprechend ihres intracerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) in verschiedene Pathogenitätsgruppen (lentogen, mesogen, velogen) eingeteilt. Entsprechend der EU-Richtlinie 92/66 (EEC 92/66) gelten alle NDV-Isolate mit einem ICPI > 0.7 als anzeigepflichtiges Seuchenvirus. Dies betrifft alle mesogenen und velogenen Isolate.

Das NDV ist ein behülltes Virus, dessen ca. 15 kb langes RNA-Genom negativer Polarität für die sechs Virusproteine NP, P, M, F, HN und L kodiert. Das Fusionsprotein (F) und das Hämagglutinin-Neuraminidase Protein (HN) werden als Spikes auf der Oberfläche der Virushülle in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar. Sie werden auch als wesentliche Determinanten für die Pathogenität angesehen.

Mit der Etablierung eines reversen genetischen Systems für NDV wurde die Möglichkeit geschaffen, sowohl gezielt nach den molekularen Ursachen für die unterschiedliche Pathogenität der Virusisolate zu forschen als auch das Virus als Vektor für Fremdgene zu nutzen, um z.B. rekombinante Vektorimpfstoffe zu entwickeln.

Entwicklung rekombinanter Vektorimpfstoffe auf der Basis des Newcastle Disease Virus

Römer-Oberdörfer, A.*, Veits, J., Wiesner, D. Starick, E. und Granzow, H.

Hochpathogene aviäre Influenza (HPAI) und Newcastle Krankheit sind Infektionen, die eine Vielzahl von Vögeln betreffen und zu großen wirtschaftlichen Verlusten in der Geflügelhaltung führen können. Das Auftreten von aviärer Influenza birgt weiterhin das Risiko des Reassortments mit humanen Influenzaviren, was zur Entstehung einer neuen Variante des Influenzavirus mit pandemischem Potential für die Menschheit führen kann. Deshalb ist die Entwicklung eines Influenzaimpfstoffes für das Geflügel, der einfach verabreicht werden kann und eine Unterscheidung zwischen vakzinierten und infizierten Tieren ermöglicht, von höchster Bedeutung. Eine Impfung gegen die Newcastle Krankheit wird mit NDV Stämmen niedriger Pathogenität (lentogen) als Lebendvakzine allgemein durchgeführt.

Das Newcastle Disease Virus wurde mit Hilfe der reversen Genetik so verändert, dass es das Hämagglutinin-Gen des aviären Influenzavirus H5N2 im Genom enthält. Die Expression des H5 Proteins konnte durch indirekte Immunfluoreszenz, Western Blot Analyse und Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Hühner, die mit dem rekombinanten NDV/AIV-H5 Virus immunisiert wurden, entwickelten

H5-Antikörper und waren gegen eine Belastungsinfektion mit hochpathogenem aviärem H5 Influenzavirus geschützt. Diese AIV-H5 exprimierende NDV Rekombinante ist als bivalente Lebendvirusvakzine sowohl gegen die Newcastle Krankheit als auch gegen aviäre Influenza vom Subtyp H5 einsetzbar. Außerdem ist durch die Anwendung eines ELISA, der spezifisch Antikörper gegen das Influenzavirus-Nukleoprotein nachweist, eine serologische Unterscheidung zwischen vakzinierten und AIV infizierten Tieren sichergestellt.

Untersuchung der molekularen Grundlage von Pathogenität und Attenuierung des NDV

Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von NDV-Isolaten auf Krebszelllinien

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

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der onkolytischen Aktivität unterschiedlicher Wildtyp-NDV-Stämme auf Krebszellen.

Bereits vor über 40 Jahren wurden die onkolytischen Eigenschaften des Newcastle Disease Virus (NDV) erkannt und seit dieser Zeit erfolgt der Einsatz verschiedener NDV-Stämme zur Krebs-Behandlung. Einschränkungen der onkolytischen Effekte durch die Bildung von Patienten-eigenen neutralisierenden Antikörpern erfordern die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, wie z.B. die Einführung einer standardisierten NDV-modifizierten Lebendzell-Tumorvakzine oder die Kombination onkolytischer Virotherapie mit Chemo- oder Bestrahlungstherapie.

Der Zusammenhang zwischen Virusstamm und onkolytischer Wirkung ist wenig untersucht. Daher wurden verschiedene NDV-Isolate unterschiedlicher Virulenz ausgewählt und ihre zytotoxische Wirkung mit Hilfe eines Proliferationsassays analysiert. Dabei wurden Unterschiede in der Zytotoxizität gefunden, die sowohl durch das jeweilige NDV Isolat als auch durch die Krebszellart bedingt waren.

Um den Einfluss der Oberflächenproteine auf die zytotoxische Wirkung zu untersuchen, werden unter Verwendung des reversen genetischen Systems rekombinante NDV erzeugt, bei denen sowohl das Fusions- als auch das Hämagglutinin-Neuraminidaseprotein des lentogenen Virus ‚Clone 30‘ durch das entsprechende Oberflächenprotein des in seiner onkolytischen Wirkung am geeignetsten erscheinenden mesogenen NDV Isolats ersetzt wird.

Etablierung und Charakterisierung persistent mit Newcastle Disease Virus infizierter Zellen

Keil, G.*, Veits, J., Höhle, C., Fischer, U. und Römer-Oberdörfer, A.

Infektion von bovinen Zellen (MDBK Zellen) mit dem velogenen NDV Isolat R5/93 führt zu abortiver Infektion der Kulturen. Ursache ist vermutlich die durch Interferon vom Typ I vermittelte Induktion eines antiviralen Zustandes. MDBK-V Zellen, die das V-Protein von Simian Virus 5 exprimieren, das den Interferon I Signalweg unterbricht, sind demgegenüber produktiv infizierbar. Allerdings überleben einige Zellen die Infektion und bilden innerhalb kurzer Zeit wieder einen geschlossenen Zellrasen. Überraschenderweise sind diese Zellen NDV-positiv und produzieren infektiöses Virus. Diese als 379-1 bezeichneten Zellen können wie MDBK-V-Zellen vermehrt werden und bleiben auch nach 60 aufeinander folgenden Passagen persistent infiziert. Im Laufe der Passagen bleibt die Menge an freigesetzter Infektiosität weitgehend konstant, es ändert sich allerdings die Morphologie der Plaques, die auf Indikatorokulturen gebildet werden. Die Fähigkeit, persistente Infektionen zu etablieren, ist keine spezielle Eigenschaft des Isolates R5/93, da dies auch bei lentogenen NDV Stämmen beobachtet wird. Die molekularen Ursachen für die Entstehung der persistenten Infektionen sind weitgehend unklar. Partielle Sequenzierungen der persistierenden NDV Genome ergaben bisher keine eindeutigen Hinweise. Die Analyse intrazellulärer Signaltransduktion ergab, dass sowohl die intranukleäre NF- κ B als auch die STAT5A-Aktivität in den persistent infizierten Zellen verändert ist, was darauf hindeutet, dass mehrere Transduktionswege von der persistenten Infektion beeinflusst werden.

1.7 BORNAVIREN

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

Borna Disease Virus Infektion von Mäusen mit defizientem NF- κ B2 Signalweg

Oesterle, K., Gagulić, E., Stitz, L. und Planz, O.*

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Genen, die bei der Immunantwort, Virusreplikation, Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind. Im Zentralnervensystem (ZNS) wurde NF- κ B eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben. Eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli induziert verschiedene Signalkaskaden der NF- κ B Aktivierung. Die meisten dieser Signalwege streben zu dem I κ B Kinase (IKK) Signalosome Komplex, der eine wichtige Rolle für die Aktivierung von NF- κ B spielt. Es werden zwei NF- κ B Signalwege unterschieden. Der klassische NF- κ B Signalweg ist bei der Regulation der „angeborenen Immunantwort“ beteiligt. Die adaptive Immunantwort hingegen wird hauptsächlich durch den alternativen NF- κ B Signalweg kontrolliert.

Bei Untersuchungen zur Kontrolle der viralen Infektion in NF- κ B defizienten Mäusen konnten wir nach Infektion mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus feststellen, dass Mäuse, die Defekte in dem alternativen NF- κ B Signalweg (NF- κ B2) besitzen, nicht in der Lage sind, die Virusinfektion zu kontrollieren. Wir haben uns nun die Frage gestellt, inwieweit ein Defekt dieses alternativen NF- κ B Signalweges die Borna Disease Virus (BDV) Infektion von Mäusen beeinflusst.

In adulten Mäusen führt eine BDV-Infektion, im Gegensatz zur BDV-Infektion von Ratten, nicht zu einer persistenten Infektion und nicht zur Ausbildung von klinischen Symptomen. Nach intrazerebraler BDV-Infektion von NF- κ B2 defizienten Mäusen konnte mit Hilfe der Western Blot Analyse 120 Tage nach der Infektion BDV-spezifisches Antigen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden durch immunhistologische Untersuchungen bestätigt. Im Gehirn der Mäuse war hauptsächlich im Großhirn BDV-spezifisches Antigen nachweisbar. Weiterhin konnten wir 120 Tage p.i. bei allen Mäusen BDV-spezifische Antikörper bestimmen. Klinische Symptome waren bei den Tieren nicht zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine intrazerebrale BDV-Infektion in NF- κ B2 defizienten Mäusen zur persistenten Infektion führt.

Parapockenvirusvektor-vermittelter Schutz gegenüber dem natürlichen Infektionsweg von Borna Disease Virus (BDV) bei Ratten

Rziha, H.-J.*, Schöffler, P., Nebrich, S. und Stitz, L.

Im Rattenmodell der Bornaschen Krankheit als Modell für eine neurodegenerative, T-Zell vermittelte immunpathologisch-bedingte Erkrankung konnte bisher ein Schutz in experimentellen Ansätzen nach direkter intrazerebraler Inokulation gezeigt werden. Bereits eine zweimalige intramuskuläre Immunisierung mit der das Nukleoprotein von BDV exprimierenden Rekombinanten D1701-VrVp40 schützt die Tiere komplett gegen die neurologische Erkrankung und führt zur Verhinderung einer persistenten Infektion durch die Eliminierung des BDV aus dem Gehirn. In einem neuen Ansatz wurde als Infektionsroute für Ratten die Aerosolinfection gewählt, die bei der natürlich auftretenden Bornaschen Krankheit als die natürliche Infektionsroute angesehen wird. In diesem Modell konnte die Wirksamkeit der D1701-VrVp40 Immunisierung gezeigt werden, wobei Ratten selbst acht Monate nach der letzten Vakzination oder nach einer Booster-Immunisierung, die vierzehn Monate nach der ersten Immunisierung erfolgte, geschützt waren. Die immunisierten und Aerosol-infizierten Ratten wurden elf Monate nach der Belastungsinfektion getötet und virologisch, serologisch und immunhistochemisch auf die Anwesenheit des BDV untersucht.

1.8 ORTHOMYXOVIREN

1.8.1 Aviäre Influenzaviren

1.8.1.1 Molekularbiologie des Virus der klassischen Geflügelpest

Versuche zur Etablierung eines reversen genetischen Systems für aviäre Influenzaviren

Mundt, E.*, Weber, S. und Werner, O.

Es wurde versucht, reverse genetische Systeme für ein gering pathogenes Virus [A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8)] zu etablieren. Von den amplifizierten und in den Vektor pHW2000 klonierten acht Genomsegmenten (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M, NS) waren vier Segmente (PA, HA, NP, NA) funktionell. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde dem HA3 des apathogenen Stammes H3N8 eine multibasische Spaltsequenz eingefügt, die auch *in vitro* funktionell war. Parallel dazu wurden die Segmente eines hoch pathogenen aviären Influenzavirus [A/chicken/Italy/445/99 (H7N1)] in den Vektor pHW2000 kloniert. Sieben dieser Segmente (PB2, PA, HA, NP, NA, M, NS) waren in Transfektionsexperimenten funktionell. Mit der Etablierung und Nutzung reverser genetischer Systeme soll untersucht werden, welche Faktoren für die Virulenzsteigerung von Influenzaviren im Hühnergeflügel unabhängig vom HA5- und HA7-Subtyp notwendig sind.

Expression eines löslichen HA7 im Baculovirus-System

Mundt, E.*

Zur Etablierung eines Kompetitions-ELISAs (cELISA) zur Spezies-unabhängigen Erkennung von HA-spezifischen Antikörpern wurde versucht, ein lösliches HA7 im Baculovirus-System zu exprimieren. Dazu wurde in einem ersten Versuch ein verkürztes HA7 eines aviären Influenzavirus [A/chicken/Italy/445/99 (H7N1)] unter Deletion der C-terminalen Transmembrandomäne exprimiert (HA7- Δ C-Bac). Nach Lyse HA7- Δ C-Bac-infizierter Zellen war das HA7- Δ C-Bac nach anschließender Zentrifugation nicht im Überstand vorhanden. In weiteren Untersuchungen wurde die N-terminale Signalsequenz mit einer anderen Signalsequenz (SQ) ausgetauscht und ein entsprechendes rekombinantes Baculovirus generiert (SQ-HA7- Δ C-Bac). Nach Lyse und Zentrifugation wurde festgestellt, dass dieses SQ-HA7- Δ C löslich war und somit für die Etablierung eines entsprechenden cELISA zur Verfügung steht.

Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung aviärer Influenzaviren

Starick, E.*, Globig, A., Harder, T. und Werner, O.

Die Untersuchung der Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) neuer AIV-Isolate liefert wichtige Aussagen für die Subtypisierung und weitere Charakterisierung der Viren, zu ihrer potentiellen Pathogenität und zu epidemiologischen Zusammenhängen.

2005 bestand die Möglichkeit, neun hochpathogene Isolate vom Subtyp H5N1 aus drei Ländern Südostasiens und aus drei verschiedenen Jahren molekularbiologisch zu charakterisieren. Von allen neun Isolaten liegen Sequenzangaben über 83 % (nt1-1482) des HA-Genes vor. Für sechs Isolate wurden die kompletten Sequenzen sowohl des HA als auch der NA erstellt. Alle neun Viren sind durch den typischen Einbau zusätzlicher basischer Aminosäuren (aa) im Spaltstellenbereich des HA gekennzeichnet, wobei die vietnamesischen Isolate eine basische aa weniger aufweisen als die aus Indonesien bzw. China. Die Analyse biologischer wichtiger Parameter im HA wie potentielle Glykosylierungs- und Rezeptorbindungsstellen ergab eine hohe Homologie zwischen allen neun Isolaten und keine essentiellen Unterschiede zu anderen HPAIV. Lediglich im Bereich einer Rezeptorbindungsstelle (aa 145) tragen die indonesischen und das chinesische Isolat ein Serin; die vietnamesischen Isolate dagegen ein Leucin. Die biologische Relevanz dieses Austausches ist nicht bekannt. Die NA-Sequenzen der Isolate sind charakterisiert durch die Deletion von 20 aa (aa 49-68, „stalk region“), ein typisches Merkmal von HPAIV.

Die Untersuchung des Isolates A/chicken/Indonesien/R60/05 nach einer Tierpassage durch Tauben und Re-Isolierung aus dem Gehirn eines am 5. Tag p.i. gestorbenen Tieres ergab eine 99,59%ige Homologie zwischen beiden Viren. Lediglich zwei funktionell nicht essentielle aa im HA2-Teil des Genomes waren verändert.

Einen anderen Schwerpunkt stellte die molekularbiologische Charakterisierung von Wildvogelisolaten dar mit dem Ziel, Aussagen zur biologischen Vielfalt von Influenzaviren in der Wildpopulation und zu möglichen Gefährdungspotentialen für Wirtschaftsgeflügel zu erhalten. In diesem Rahmen wurden die HA-Gene von sieben Wildvogel-Isolaten (5 Enten, 1 Möwe, 1 Krähe) der Subtypen H3, H5, H7 und H13 aus Deutschland sequenziert (GenBank-Acc.Nr. AM087220-224). In Ergänzung dazu konnten sechs AIV-Isolate aus dem Iran näher charakterisiert werden. Sie stammten alle von Wildenten und gehörten zu den Subtypen H3, H7, H9 und H10 (GenBank-Acc.Nr. AM087214-219). Mittels Neuraminidase-Hemmtest wurden die NA-Subtypen aller Wildvogelisolatate ermittelt.

Molekulare Diagnostik aviärer Influenzavirusinfektionen

Starick, E.*, Hoffmann, B., Harder, T. und Werner, O.

Im Rahmen der Charakterisierung von Einsendungsmaterial aus dem NRL wurden 2005 mittels RT-PCR an insgesamt 140 Proben aus 48 Einsendungen Untersuchungen zum Nachweis bzw. Ausschluss von AIV-RNA sowie für die Bestimmung des Hämagglutinin(HA)-Subtyps durchgeführt. Dafür wurden im Durchschnitt vier verschiedene Methoden je Probe eingesetzt, so dass die Gesamtzahl der in diesem Rahmen durchgeführten RT-PCR-Tests etwa 560 beträgt.

Um Aussagen zur Pathogenität bzw. zur näheren Charakterisierung der Isolate zu gewinnen, wurden darüber hinaus von vierzehn AIV- und fünf PMV-1-positiven Proben die Spaltstellenbereiche der jeweiligen Oberflächenproteine (HA bzw. F) sequenziert. Zehn dieser Proben stammten von Wirtschaftsgeflügel und neun von Wild- oder Ziervögeln. Dabei wurden neun Proben als HPAIV, fünf als LPAIV, vier als gering- und eine als hochpathogenes PMV-1 charakterisiert.

Für die 2004 etablierte RT *real time* PCR zum Nachweis des AIV-M-Genes wurden Untersuchungen zur Ermittlung des Grenzwertes sowie zu Sensitivität und Spezifität anhand von Organ- und Tupferproben fortgeführt. Aus der Testung sowohl positiver als auch negativer Proben wurde deutlich, dass Proben mit einem *threshold cycle*-Wert ab 37 als fraglich eingestuft und mit anderen Methoden abgeklärt werden müssen. Die Testung negativer Organproben von Tieren aus Quarantänehaltung ergab eine diagnostische Spezifität von 100 %. Die Sensitivität der Methode lag für Einzelproben bei 80 bis 90 %, wenn Tupfer- oder Organproben von LPAIV-infizierten Tieren untersucht wurden.

Entwicklung und Etablierung von RT *real-time* PCR Systemen zum Nachweis und zur partiellen Subtypisierung von AIV

Hoffmann, B.*, Starick, E., Werner, O. und Harder, T.

Neben konventionellen RT-PCR-Systemen zum Nachweis des Virus der Aviären Influenza (AIV) wurden auch RT *real time* PCR-Systeme für eine schnelle Probenanalyse entwickelt und etabliert. Hierbei wurde ein Stufenkonzept aufgebaut, welches mit dem sensitiven Nachweis von Influenza A-Virus (IAV)-Genom startet. Die M-Gen basierte RT *real time* PCR, publiziert von Spackman et al. (2002), wurde als sehr sensitiver und Genus-spezifischer Test etabliert. Zur Überprüfung der RNA-Extraktion und der RT-PCR wurde dieser IAV-spezifische Test ohne Sensitivitätsverlust mit einem heterologen internen Kontrollsystem kombiniert.

In der 2. Stufe der RT *real time* PCR-Diagnostik zum Nachweis von AIV wurden verschiedene Nachweis-systeme für die potentiell hochpathogenen AIV-Subtypen H5 und H7 entwickelt. Aufgrund der hohen Variabilität des Hämagglutinin-Gens wurden zwei verschiedene H5-Tests etabliert. Neben dem H5-Assay, publiziert von Spackman et al. (2002), wurde ein neuer H5-Test entwickelt. Dieser H5-Test weist im Vergleich zur Spackman-PCR höhere Detektionsraten für die aktuell zirkulierenden H5N1-Isolate asiatischer Herkunft auf.

Im Falle der positiven Detektion eines H5-Isolates folgt, aus aktuellem Anlass, die 3. Stufe der AIV RT *real time* PCR-Diagnostik. Durch die Etablierung des N1-Tests, publiziert durch Payungporn et al. (2005), kann der vorläufige Befund „AIV-H5N1“ sehr schnell gestellt werden. Die Sequenzierung der HA-Spaltstelle ist jedoch weiterhin erforderlich, um eine Einschätzung des Pathotyps vorzunehmen.

Die umfangreiche Stammsammlung des Friedrich-Loeffler-Instituts erlaubt eine optimierte Validierung von publizierten und neu entwickelten AIV RT *real time* PCR-Systemen. Für die Entwicklung und Einschätzung der aufgeführten RT *real time* PCR-Systeme wurden mehr als 70 AIV-Stämme der verschie-

denen HA- und NA-Subtypen analysiert. Das vorgestellte Stufenmodell zur molekularen AIV-Diagnostik ermöglicht die sichere Detektion der tierseuchenrechtlich relevanten Subtypen mit minimalem Aufwand.

Prüfung verschiedener Testkits auf Eignung zum schnellen Nachweis von aviärem Influenzavirus

Harder, T., Hoffmann, B. und Werner, O.*

In der Humanmedizin werden für die schnelle Diagnosestellung in der Praxis kommerzielle Influenza-Schnelltests eingesetzt, bei denen es sich um chromatographische Immunoassays zum Nachweis von Influenzavirus-Antigen handelt. Zehn derartige Schnelltests wurden auf Eignung für den Nachweis aviärer Influenzaviren geprüft. Nur vier davon waren speziell für den Nachweis von Influenzavirus bei Geflügel/Vögeln entwickelt worden, sechs Tests sind für die Anwendung in der Humanmedizin konzipiert. Mit allen geprüften Tests konnten aviäre Influenzaviren der Subtypen H5, H6, H7 und H9 nachgewiesen werden, darunter auch aktuelles H5N1-Virus aus Asien. Die Empfindlichkeit der Tests war jedoch sehr unterschiedlich. Die Tests eignen sich auch für die Untersuchung von Rachen- und Kloakentupferproben von Geflügel. Für eine positive Reaktion ist allerdings eine beträchtliche Virusmenge notwendig, wie sie in der Regel nur nach einer Infektion mit hochpathogenen Virusstämmen bei klinisch erkrankten Tieren erreicht wird. Für Überwachungsuntersuchungen von gesunden Tieren auf Influenzavirus eignen sich die Schnelltests auf Grund der geringen Sensitivität nicht, da von infizierten, aber klinisch gesunden Tieren in der Regel nur sehr wenig und auch nicht kontinuierlich Virus ausgeschieden wird.

1.8.1.2 Pathogenesestudien zu Influenzavirusinfektionen bei Geflügel und Schwein

Infektionsstudien mit hochpathogenem aviärem Influenzavirus H5N1/Asia an Hühnern, Enten, Tauben und Schweinen

Beer, M., Globig, A., Harder, T., Hoffmann, B., Starick, E., Teifke, J.P. und Werner, O.*

Die derzeitigen verlustreichen Geflügelpestausbüche in verschiedenen Ländern Asiens und Europas werden durch hochpathogenes aviäres Influenzavirus vom Subtyp H5N1 verursacht, das nicht nur verschiedene Geflügel- und Vogelarten befällt, sondern auch Säugetiere und Menschen infizieren kann. Zur biologischen Charakterisierung von H5N1-Isolaten aus Asien wurden verschiedene Tierarten experimentell infiziert und Klinik, Pathologie, Virusvermehrung, Virusausscheidung und Antikörperbildung untersucht. Im intravenösen Pathogenitätstest wurde für ein H5N1-Isolat aus Vietnam ein Index (IVPI) von 3,0 ermittelt.

Alle infizierten Hühner waren 20 Stunden nach der Infektion tot. Bei okulonasaler Infektion von Hühnern führten Infektionsdosen ab 10^3 EID₅₀ zur Erkrankung und am 2. Tag p.i. zum Tod. Die Tiere zeigten Atembeschwerden, und einige hatten blutigen Schleim in der Schnabelhöhle. Durchfall wurde kaum beobachtet. Sowohl in Rachen- als auch in Kloakenabstrichen ließen sich große Virusmengen (bis 10^6 EID₅₀) nachweisen. Auffällige Sektionsbefunde waren hämorrhagische Entzündung von Trachea und Kehlkopf sowie Pneumonie. Mit geringerer Dosis infizierte Hühner erkrankten nicht und bildeten auch keine Antikörper.

Pekingenten erkrankten ab einer Infektionsdosis von 10^4 EID₅₀. Nur bei ca. 60 % der Tiere führte die Erkrankung 4 bis 6 Tag p.i. zum Tod, wobei keine Relation zwischen Mortalität und Infektionsdosis bestand. Die Enten zeigten vor allem unterschiedlich stark ausgeprägte zentralnervöse Symptome wie Opisthotonus, Zwangsbewegungen und Lähmungen, einige auch Hornhauttrübung und Erblindung. Von den überlebenden Tieren wirkten einige bei Versuchsabschluss am 23. Tag p.i. wieder klinisch gesund, zwei Enten litten noch immer an zentralnervösen Störungen. Alle Tiere schieden das Virus aus, wobei der Virusgehalt im Rachenabstrich meist höher war als im Kloakentupfer. Bei der Sektion fielen vereinzelt subepikardiale Blutungen am Herzen sowie eine hämorrhagische Pankreatitis und eine katarrhalische Enteritis auf. Bei allen Enten wurden Antikörper gegen H5 festgestellt, auch bei der mit einer geringeren Dosis von 10^3 EID₅₀ infizierten Gruppe, die nicht erkrankt war.

Bei fünf von 16 Tauben führte die okulonasale Infektion mit einer hohen Virusdosis zur Erkrankung mit zentralnervösen Symptomen wie Bewegungsstörungen und Zwangshaltungen. Drei Tauben sind verendet und hatten eine stark ausgeprägte nicht eitrig und nekrotisierende Enzephalomyelitis. Von allen inneren Organen hatte das Gehirn mit 10^6 EID₅₀/0,2 ml den höchsten Virusgehalt. Bei einigen Tauben ließ sich

bis 6 Tage p.i. in Rachen- und Kloakenabstrichen Virus nachweisen. Die ausgeschiedene Virusmenge reichte aber nicht aus, um in der gleichen Voliere gehaltene Sentinelhühner zu infizieren. Alle infizierten Tauben bildeten Antikörper.

Schweine reagierten auf eine nasale oder orale Applikation von je 10 ml virushaltiger Allantoisflüssigkeit weder mit einer klinischen Erkrankung noch mit Antikörperbildung. In Nasen- und Analabstrichen wurde kein Virus nachgewiesen und Sentinelhühner sind nicht erkrankt. Die Ergebnisse zeigen die unterschiedliche Empfänglichkeit der verschiedenen Spezies und ihre unterschiedliche Bedeutung bei der Weiterverbreitung des Erregers.

1.8.1.3 Entwicklung und Prüfung von rekombinanten bzw. Markerimpfstoffen gegen Klassische Geflügelpest

Prüfung inaktivierter Vollvirusvakzine (H5N2) bei Enten gegen Infektionen mit dem Geflügelpestvirus H5N1 asiatischer Prägung

Harder, T.*, Hoffmann, B., Teifke, J.P., Globig, A., Sänger, K., Beer, M. und Werner, O.

Die Eignung zweier konventioneller Ölemulsionsvakzinen basierend auf inaktiviertem Vollvirus H5N2 (Gruppen A und B) und eine Ölemulsionsvakzine basierend auf mittels Baculovirus exprimiertem H5-Antigen (Gruppe C) wurde in einem Belastungsversuch in fünf Wochen alten Pekingenten im Vergleich zu einer Placebogruppe (D) geprüft.

Dreißig Tage nach einmaliger subkutaner Vakzination mit einer Dosis von 1 ml/Tier wurden die Probanden oral, intranasal und konjunktival mit einer für Hühner letalen Dosis des hochpathogenen Influenzavirus A/dk/Vietnam/TG24-01/05 inokuliert. Die Protektion wurde durch Verfolgung der Klinik und der Messung der Virusausscheidung mittels *real time* PCR bewertet.

Die Tiere der Vakzinegruppen A und B waren vollständig gegenüber klinischen Erscheinungen geschützt und schieden lediglich geringe Mengen Virus aus. Dagegen erkrankten alle Vögel der Placebogruppe schwer und schieden auch Virus in hohen Konzentration aus (Letalitätsrate 11/16). In der Vakzinegruppe C starb ein Tier und bei den anderen Probanden dieser Gruppe wurden milde bis mäßig starke, vor allem neurologische Symptome beobachtet. Bezüglich der Virusausscheidung nahmen diese Tiere eine intermediäre Stellung ein; besonders über den Oropharynx wurden mäßig hohe Viruskonzentrationen ausgeschieden.

Ein vollständiger klinischer Schutz sowie eine erhebliche Reduktion der Virusausscheidung wurde durch einmalige Vakzination mit einem herkömmlichen inaktivierten Vollvirusimpfstoff gegen eine Belastung mit einem hochpathogenen H5N1 Geflügelpestvirus in Pekingenten erzielt.

1.8.1.4 Überwachungsuntersuchungen zum Vorkommen von Inflenzaviren bei Wildvögeln

Ergebnisse einer zweijährigen Studie zum Vorkommen von Inflenzaviren bei Wildvögeln

Globig, A.*, Starick, E. und Werner, O.

Um das Vorkommen von aviären Inflenzaviren (AIV) bei Wildvögeln zu bestimmen, wurden in Deutschland mit der Hilfe von ehrenamtlichen Beringern und Jägern zwischen März 2003 und Januar 2005 von mehr als 3.000 Wildvögeln Kloakenabstriche genommen und 1.151 daraus erstellte Probenpools mittels Eikultur untersucht. Die Proben stammten von Individuen 79 verschiedener Vogelarten (Stand- und Zugvögel) aus 80 Beprobungsorten in Deutschland.

Es konnten 40 aviäre Inflenzaviren in vierzehn Kombinationen aus acht verschiedenen Hämagglutinin- und acht Neuraminidasesubtypen, darunter auch H5 und H7, isoliert werden. Alle H5- und H7-Isolate erwiesen sich als geringpathogen. Insgesamt wurde bei 3,5 % der untersuchten gepoolten Wildvogelproben Virus isoliert. Dabei zeigten sich deutliche Verteilungsmuster bezüglich der untersuchten Arten, der Jahreszeit und des Beprobungsorts. Alle AIV-Isolate stammten von Vögeln, die im Herbst beprobt worden waren. Die meisten Isolate stammten von Stockenten an Rast- und Überwinterungsplätzen der nord- und ostdeutschen Küste, die nach Erkenntnissen der wissenschaftlichen Vogelberingung im hohen Norden brüten. In der Nähe solcher Rastgebiete sollte Geflügel in Freilandhaltung regelmäßig auf Inflenzavirus untersucht werden. Ein kontinuierlich durchgeführtes Inflenzamonitoring sowohl zur

Gefährdungseinschätzung von Geflügel in Freilandhaltung durch infizierte Wildvögel als auch im Hinblick auf ein mögliches Vorkommen des hochpathogenen asiatischen H5N1 Virus erscheint essentiell.

Überwachungsuntersuchung mittels RT-PCR bei Wildenten und -gänsen sowie Möwen an Rast- und Überwinterungsgebieten in Deutschland im Herbst 2005

Harder, T.*, Globig, A., Starick, E. und Werner, O.

Entsprechend der Eilverordnung des Bundes zum Schutz vor der Geflügelpest wurden ausgedehnte virologische Untersuchungen von Wildvogelproben in den Bundesländern und am FLI initiiert. Die Screening-Untersuchungen erfolgten erstmals mittels molekularer Verfahren (*real time* oder konventioneller RT-PCR) an Probenpools. In den PCRs positiv getestete Proben (n=332) wurden dem NRL zugesandt und weiter charakterisiert. Insgesamt konnten 75,3 % der eingesandten Proben als positiv in der PCR bestätigt und 31 AIV-Isolate gewonnen werden. Darunter befanden sich auch solche der Subtypen H5 und H7, die sich jedoch in weiteren Untersuchungen als geringpathogen erwiesen. Die H5-Isolate konnten phylogenetisch der europäischen Linie zugeordnet werden. Daneben wurden auch am FLI Untersuchungen direkt eingesandter Proben von Enten (n = 647), Gänsen (n = 38), Möwen (n = 52) und Rallen (n = 20) ausgewählter Standorte durchgeführt. Die Auswahl der Beprobungsgebiete erfolgte nach Erkenntnissen der vorjährigen Untersuchungen an Wildvögeln, bei denen eine hohe Prävalenz von AIV in diesen Gebieten festgestellt wurde. Aus den bislang untersuchten Proben konnten zwei AIV H3N8, ein AIV H4N6, H4N? und H1-Isolate gewonnen werden. Die Isolate wurden ausschließlich von Stockenten der Insel Föhr gewonnen. Die Screening-Untersuchungen mittels PCR erwiesen sich als sensitiver im Vergleich zur Virusisolierung. AIV-Isolate konnten auch in Wildvögeln südlicher Bundesländer nachgewiesen werden. Hinweise auf das Vorkommen von H5-Viren asiatischer Herkunft wurden nicht gewonnen.

1.8.1.5 Untersuchungen zur Epidemiologie und Risikobewertung

Mission zur epidemiologischen Einschätzung der Überwachung und Bekämpfung der Geflügelpest in Bulgarien (16.-20.10.2005)

Pöttsch, C.J.*

(in Zusammenarbeit mit Cattoli, G.)

Auftraggeber: Europäische Kommission, DG Sanco

Das Hauptziel der Mission war es, die Geflügelpestsituation in Bulgarien einzuschätzen sowie epidemiologische und diagnostische Hilfe anzubieten. Die Aufmerksamkeit wichtiger Teile der Gesellschaft in Bulgarien war während dieser Zeit auf Geflügelpest gerichtet, da es Ausbrüche im benachbarten Rumänien und der Türkei sowie Verdachtsmeldungen aus Griechenland und Mazedonien gab. Alle Verdachtsfälle in Bulgarien wurden abgeklärt und es gab keine diagnostischen Anhaltspunkte für das Vorhandensein von HPAI H5-Infektionen bis zum Ende der Mission. Empfehlungen zur epidemiologischen Situation im Rahmen der Mission betrafen vor allem die Erstellung von detaillierten Notfallplänen, die risikobasierte Abklärung von Morbidität und Mortalität von Hausgeflügel und Wildvögeln sowie die Anwendung strategischer Maßnahmen der Seuchenhygiene. Empfehlungen zu Verbesserungen im diagnostischen Bereich fokussierten auf die Verfügbarkeit von ausgebildetem Personal, diagnostischer Methoden und labordiagnostischer Ausstattung. Unterstützung zur Umsetzung der empfohlenen Maßnahmen wurde angeboten.

Qualitative Risikobewertung zur Einschleppung von hochpathogenem aviärem Influenzavirus H5N1 aus den europäischen Ausbruchsländern nach Deutschland

Pöttsch, C.J.*, Unger, F., Staubach, C., Teske, K., Teuffert, J., Kramer, M., Globig, A., Harder, T., Werner, O., Conraths, F.J. und Mettenleiter, T.C.

Mit der Meldung von Ausbrüchen hochpathogener aviärer Influenza H5N1 in Russland vom 05.08.2005 in der Region Nowosibirsk sowie von Ausbrüchen in Nordwestchina, der Mongolei und Kasachstan zwischen Juni und August 2005 war eine Neubewertung der Gefährdungslage für Deutschland notwendig. Im August 2005 wurde eine erste qualitative Risikobewertung zur Einschleppung von hochpathogenem

aviärem Influenzavirus H5N1 aus Russland erstellt. Die Risikobewertung wurde bei Bedarf aktualisiert und neue Bewertungen wurden bei Vorliegen einer veränderten Situation erstellt, insbesondere nach dem Auftreten von Fällen in europäischen Ländern und der Türkei. In der Risikobewertung wurden die folgenden Expositionen bewertet: legaler und illegaler Handel, Personenverkehr sowie Zugvögel. 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.

Die Risikobewertungen waren eine wertvolle Informationsquelle und Entscheidungshilfe für Politik, Wissenschaft, die Medien und die Öffentlichkeit. Sie wurden auf den Internetseiten des FLI und des Tierseuchen-Nachrichtensystems (TSN) veröffentlicht.

Epidemiologisches Bulletin: Lagebericht zur aviären Influenza

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

Das FLI gab seit dem 01.11.2005 mit dem Epidemiologischen Bulletin einen Bericht zur Situation und Entwicklung der hochpathogenen aviären Influenza (HPAI) H5N1 bei Tieren in Europa und der Welt heraus. Anfang Oktober 2005 wurde HPAI H5N1 in Rumänien und damit erstmalig in Europa nachgewiesen. Weitere Fälle folgten im Oktober 2005 im europäischen Teil Russlands, in Kroatien sowie im östlichen Teil der Türkei. Seit Dezember 2005 wurden auch Ausbrüche aus der Ukraine gemeldet. Insgesamt lagen bis Ende 2005 für Europa Meldungen aus Rumänien für 26 Ausbrüche und sieben Verdachtsfälle, aus Kroatien für drei Ausbrüche, aus dem europäischen Teil Russlands für vier Ausbrüche und aus der Ukraine für 17 Ausbrüche und zwölf Verdachtsfälle vor. Aus der Türkei wurden bis dahin je ein Ausbruch und ein Verdachtsfall offiziell gemeldet. Das Epidemiologische Bulletin diente der Information und Unterstützung der Entscheidungsfindung für verschiedene Einrichtungen (z.B. FLI, BMVEL/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 28 Ausgaben neu verfasst.

1.8.2 Porcine Influenzaviren

Schweineinfluenzavirus (SIV): Untersuchungen zur minimalen Infektionsdosis

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

In einem ersten Infektionsversuch wurden Absatzferkel mit einem Feldisolat des SIV H1N1 oronasal infiziert (Infektionsdosis: 5.120 HAE pro Tier). Die Tiere serokonvertierten innerhalb von 14 Tagen p.i. Sie entwickelten p.i. jedoch keine klinischen Symptome. Auch konnte kein Virus isoliert werden, weder im bebrüteten Hühnerei noch in der Zellkultur. Pathomorphologisch waren die Schweine unauffällig.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der eingesetzten Infektionsdosis keine klinische Infektion auszulösen war, was in früheren Versuchen mit einem anderen H1N1-Isolat gelang. Weitere Untersuchungen sind daher mit höherer Infektionsdosis und jüngeren Tieren vorgesehen.

1.9 BIRNAVIREN

1.9.1 Virus der infektiösen Bursitis (Infectious bursal disease virus, IBDV)

Das Virus der infektiösen Bursitis (IBDV) gehört zur Familie *Birnaviridae*. Birnaviren zeichnen sich durch ein bisegmentiertes Genom aus doppelsträngiger RNA aus, das in einem ikosaedrischen Kapsid verpackt ist. IBDV verursacht eine immunsuppressive Erkrankung beim Hühnergeflügel infolge lytischer Infektion von proliferierenden B-Lymphozyten. Diese infektiöse Bursitis, auch Gumboro-Krankheit genannt, führt in der Nutzgeflügelhaltung zu großen Verlusten. In der Vergangenheit mussten die verfügbaren Impfstoffe immer wieder angepasst werden, da Varianten mit gesteigerter Pathogenität sowie mit veränderter

Antigenität auftraten. Die Forschungsprojekte beschäftigen sich mit der Aufklärung der molekularen Grundlagen für diese Veränderung.

Funktionelle Charakterisierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des IBDV

Letzel, T.*, Stricker, R. und Mundt, E.

Untersuchungen zur Regulation der Replikation des IBDV und hier insbesondere zur Bedeutung und Funktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp, VP1) stellen weiterhin einen Schwerpunkt bei den Studien zur Biologie der Birnaviren dar. Zur genaueren funktionellen Charakterisierung des VP1 wurde ein etabliertes *In-vitro*-System zur Transkription viraler RNA genutzt. VP1 wurde im Baculovirussystem exprimiert und mittels einer His-Sequenz gereinigt. In der Vergangenheit wurde untersucht, ob ein bestimmtes RdRp-Motif des VP1 funktionell aktiv ist. In weiteren Experimenten sollte die Spezifität der Transkriptaseaktivität, RNA-bindende Eigenschaften des VP1 und der Einfluss verschiedener Ionen auf die Enzymaktivität untersucht werden.

Es stellte sich heraus, dass das gereinigte VP1 sowohl ein IBDV-spezifisches Transkript als auch ein nicht-virales Transkript unter den gewählten Reaktionsbedingungen als Matrize für die Transkription nutzte. Auch die Zugabe von gereinigtem, Baculovirus-exprimiertem VP3 des IBDV in den Reaktionsansatz zeigte keine Steigerung der Spezifität des VP1 bezüglich der Matrize. In RNA-Protein-Bindungsstudien wurde beobachtet, dass das VP1 sowohl virale als auch nicht-virale RNA band. Dies erklärt, warum VP1 in der Lage war, auch nicht-virale cRNA als Matrize zu nutzen. In weiteren Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Ionen auf die RdRp-Aktivität des VP1 haben. Dabei erbrachte der Vergleich von $MgCl_2$ mit $MgSO_4$ bzw. $MnCl_2$ mit $MnSO_4$ keinen signifikanten Unterschied. Interessanterweise zeigte der Vergleich von $CoCl_2$ mit $CoSO_4$, dass nach Zusatz mit $CoCl_2$ eine höhere Aktivität als mit $CoSO_4$ zu beobachten war. Damit wurde erstmals gezeigt, dass Anionen unter bestimmten Bedingungen die Reaktivität einer RdRp beeinflussen können. In vorangegangenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass nach Zusatz von Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen kein Reaktionsprodukt zu beobachten war, wobei der Zusatz von Mg^{2+} als Kofaktor die Enzymaktivität des VP1 ermöglichte. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob diese Ionen die Wirkung der Mg^{2+} -Ionen kompetieren können. Bei der simultanen Inkubation von Ca^{2+} und Mg^{2+} wurde kein Unterschied beobachtet. Es wurde jedoch festgestellt, dass Ca^{2+} -Ionen wesentlich effizienter Mg^{2+} -Ionen kompetieren können als umgekehrt. Dies scheint ein erster Hinweis darauf zu sein, wie die virale Replikation in der Zelle reguliert sein könnte. Der Zusatz von Zn^{2+} -Ionen steigerte die Reaktivität des Enzyms zehnfach. Dies lässt auf einen allosterischen Effekt der Zn^{2+} -Ionen während der Transkriptionsreaktion schließen.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das VP1 unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine Helikaseaktivität besitzt. Dieses Ergebnis bestätigte Computeranalysen, die keine für Helikase bekannten Motive im VP1 ergaben.

Untersuchungen zur Funktion des VP5 des IBDV

Mundt, E.*

Das VP5 ist kein essentielles Nichtstrukturprotein des IBDV. Der Vergleich der Replikation einer VP5-Deletionsmutante (IBDV-VP5m) mit dem Wildtypvirus (IBDV-WT) in Zellkultur zeigte, dass im Zellkulturüberstand des VP5m-IBDV geringere Virustiter vorhanden waren als im Zellkulturüberstand des IBDV-WT. Die Titer in den infizierten Zellen beider Viren waren hingegen ähnlich. Für das VP5 wurde eine Funktion als Viruporin vermutet.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde beobachtet, dass das VP5 auf der Membran infizierter Zellen vorhanden war und dass bestimmte VP5-kodierte Cysteine dafür verantwortlich sind. Es wurde weiterhin festgestellt, dass andere virale Proteine für die Lokalisation des VP5 auf der Zellmembran nicht notwendig waren. Dies wurde an nicht fixierten Zellen nach alleiniger Expression des VP5 mittels eines eukaryotischen Expressionsvektors beobachtet. Für die Untersuchungen, ob das VP5 ein Viroporin darstellt, wurde der Translations-Inhibitor Hygromycin B sowohl IBDV-WT- als auch IBDV-VP5m-infizierter Zellkultur zugesetzt und die VP5-Expression in „pulse-chase“-Experimenten mit radioaktiv markierten Aminosäuren untersucht. Es wurde in vergleichbarem Umfang die Translation in beiden infizierten Zellkulturen inhibiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das VP5 wahrscheinlich kein Viroporin darstellt und die vermutete Unterstützung der Virusfreisetzung einem anderen Mechanismus folgt.

1.10 REOVIREN

1.10.1 Aviäre Rotaviren

Das Malabsorptionssyndrom oder Runting-and-Stunting-Syndrom (RSS) stellt bei Broilerküken eine Erkrankung mit hoher wirtschaftlicher Bedeutung dar. In der Vergangenheit wurden verschiedene Erreger (Viren, Bakterien) als Ursache für das RSS diskutiert, jedoch gelang es bisher nicht, mit einzelnen Erregern, insbesondere Reoviren, diese Erkrankung im Infektionsexperiment auszulösen. Bei Untersuchungen von Broilerküken mit RSS aus Norddeutschland konnten wir als ätiologische Agenzien Rotaviren (RV) der Gruppe (gp) D allein oder in Kombination mit RV der Gruppe A nachweisen. Deshalb bestand das Ziel der geplanten Untersuchungen in der Auslösung der Erkrankung bei Broilerküken unter experimentellen Bedingungen, um die ätiologische Rolle von RV für das RSS aufklären zu können.

Experimentelle Infektion von Küken mit Rotavirus der Gruppe D

Otto, P.*, Liebler-Tenorio, E., Reetz, J. und Löhren, U.

(in Zusammenarbeit mit Dr. C. Grund [Institut für Geflügelkrankheiten, Vet. Med. Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim])

Die Versuche zur Vermehrung von RV gpD auf verschiedenen Zellkulturen waren nicht erfolgreich. Um Infektionsmaterial für entsprechende Belastungsinfektionen von Küken zu erhalten, wurde das Inokulum *in vivo* präpariert. Dazu wurde Darminhalt von einem an RSS erkrankten Küken ausgewählt, in dem massenhaft RV gpD festgestellt worden waren. Andere Viren konnten elektronenoptisch nicht gefunden werden. Jedes Tier erhielt 0,2 ml des präparierten Darminhalts per Kropfinstillation am Lebenstag 0, 7 oder 14 verabreicht. Die am 7. und 14. Tag infizierten Tiere zeigten am 2. bis 4. Tag p.i. leichten Durchfall. Am 1. bis 6. Tag p.i. wurden jeweils zwei Tiere getötet und der Darminhalt auf das Vorhandensein von RV gpD und anderer viraler Erreger mittels Elektronenmikroskop und PAGE untersucht. Für die Infektion von weiteren vierzehn Küken wurde der Darminhalt von mehreren Tieren gepoolt. Diese vierzehn Tiere wurden am Lebenstag 0 infiziert und jeweils am Tag 4 und 5 p.i. in gleicher Anzahl getötet. In der folgenden Tabelle sind die Virusbefunde der Darminhaltsproben aller 50 Küken aufgelistet:

Alter bei Infektion (Tage)	Alter bei Sektion (Tage) p.i.	n	gpD RV positiv	SRP positiv
0	1-3	6	1	2
7	1-3	6	2	0
14	1-3	6	1	0
0	4-6	6	3	3
7	4-6	6	0	5
14	4-6	6	3	2
0	4	7	7	7
0	5	7	7	7

* SRP – kleine, runde, wenig strukturierte virusähnliche Partikel

Von drei Tieren wurde der Darminhalt mit hoher Partikelanzahl von RV gpD präpariert und als Inokulum für den eigentlichen Belastungsversuch (Hauptversuch) eingesetzt.

256 Broilerküken wurden insgesamt in den Hauptversuch einbezogen. Nach dem Schlupf wurden die Tiere zufällig den Versuchsgruppen zugeteilt. Vier Gruppen von je 28 Küken wurden in je einen separaten Raum des Gebäudes A verbracht. Die übrigen 144 Tiere der Gruppe 5 wurden in einem Raum des Gebäudes B gehalten. Die Tiere der Gruppen 1 bis 4 wurden am ersten Lebenstag infiziert mit jeweils 0,2 ml: RV gpA (Rotavirusisolat 02V0002G3), RV gpD (Darminhalt, Inokulum aus Vorversuch), RV gpA + gpD oder Darmhomogenat von RSS-kranken Küken (Feldmaterial, positive Kontrolle). Die 28 Küken der Gruppe 5 erhielten ein Gemisch aus Zellkulturmedium und Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (negative Kontrolle). Am Tag 7 wurden jeweils 28 Tiere aus der Gruppe 5 den Gruppen 1 bis 4 zugestellt. Von allen Tieren wurden täglich Körpergewicht sowie die klinischen Symptome erfasst. Die Sektion von jeweils fünf bzw. sieben Küken aus jeder Gruppe erfolgte am Tag 1, 3, 6 oder 20 p.i. bzw. nach Zustellung der Tiere. Von den getöteten Tieren wurden folgende Proben für virologische, immunologische und histopathologische Untersuchungen gewonnen:

Blut, Darminhalt, Duodenum mit Pankreas, mittleres und distales Jejunum, Caecaltonsillen, Leber, Herz, Lunge, Niere, Milz, Thymus und *Bursa fabricii*. Von einigen Tieren wurde der gesamte Darm intraluminal mit Formalin fixiert.

Mit folgenden Untersuchungen soll die ätiologische Rolle von Rotaviren für die Entstehung des RSS ermittelt werden:

- Nachweis von Rotaviren und anderen Virusarten (TEM, PAGE, PCR, Isolierung)
 - Bestimmung von Antikörpern gegen RV gpA (SNT)
 - Erfassung histologischer Veränderungen im Darm und anderer Organe (Paraffinschnitte, H&E-Färbung, Morphometrie)
 - Ermittlung der Verteilung der Veränderungen im Darm (Intraluminal fixierter Darm, Paraffinschnitte, H&E-Färbung)
 - Lokalisation bzw. Detektion von RV im Gewebe (Immunhistologie, Kryoschnitte)
- Ultrastrukturelle Feststellung von RV in der Darmmukosa (TEM, epon-Einbettung von Gewebe).

Molekularbiologische Nachweismethode (RT *real-time* PCR) für atypische aviäre Rotaviren der Gruppe D

Roth, B., Elschner, M., Heller, M. und Otto, P.*

Erste Gensegmente eines aviären RV gpD (03V0565) wurden über eine „Sequenz-unabhängige RT-PCR dsRNA Klonierungsstrategie“ erhalten. Aufgrund dieser Sequenzdaten des VP6-Gens konnte eine RT Taqman PCR für die Diagnostik etabliert werden. Diese Methode zum Nachweis von RV gpD wurde mit vorhandenen Isolaten auf Spezifität und Sensitivität geprüft.

Molekularbiologische Untersuchungen von zwei weiteren RV-Stämmen der Gruppe D aus Norddeutschland (02V0481) bzw. England (05V0273) ergaben eine hohe Identität der Nukleotidsequenzen für VP6 (90,7%) untereinander bzw. entsprechend 98,5% bei den abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

Der komplette Leserahmen des VP6-Gens aller drei oben beschriebenen RV-Stämme wurde mit Hilfe von Gateway-Cloning in Plasmidvektoren überführt. Durch diese Methode war eine schnelle Klonierung der VP6-Gene in unterschiedliche Expressionsvektoren möglich. Probeexpressionen in *E.coli* lieferten die entsprechenden Proteine (ca. 45 kDa), die nach erfolgreicher Aufreinigung zur Immunisierung und anschließenden Gewinnung monoklonaler Antikörper eingesetzt werden können.

1.10.2 Bovine Rotaviren

Expression und Charakterisierung der inneren und äußeren Kapsidproteine des bovinen Gruppe A Rotavirus B223

Vahlenkamp, T.W.*, Wink, K. und Keil, G.M.

Rotaviruspartikel besitzen drei Proteinhüllen, die das Genom bestehend aus elf Doppelstrang (ds)-RNA-Segmenten umschließen. Die Gensegmente 6, 4 und 9 kodieren für das innere (VP6) und das äußere (VP4, VP7) Kapsidprotein.

Nach Klonierung dieser Gensegmente wurde die Expression der Proteine in transienten Transfektionsexperimenten in RK13 Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz bestätigt. Das gesamte Protein VP6 wurde ebenfalls im Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem und Abschnitte von VP7 und VP4 als GST-Fusionsprotein in einem pGEX-4T-1® Vektor basierten prokaryotischen Expressionssystem exprimiert. In Kaninchen gewonnene Antiseren gegen VP6 und VP4 zeigten spezifische Immunfluoreszenz-Färbungen auf Rotavirus-infizierten MA104 Zellen und reagierten ebenfalls spezifisch mit Proteinen der erwarteten Größe von 44,8 und 86,7 kDa im Western Blot.

VP4 wird enzymatisch durch Trypsin in die Fragmente VP8 (aa 1-241) und VP5 (aa 247-776) gespalten. Die Sequenzierung von VP4 ergab, dass das für die Klonierung verwendete B223 Virus aufgrund fehlender Cysteine keine internen Disulfid-Brücken aufbauen kann. Die meisten animalen Rotaviren besitzen die Möglichkeit der Bildung zweier interner Disulfid-Brücken zwischen den Cysteinen an Position 203 (Cys-203) und Cys-216 des VP8 und zwischen Cys-318 und Cys-380 des VP5. Auch bei den meisten Rotaviren des Menschen ist zumindest die Bildung einer internen Disulfid-Brücke zwischen Cys-318 und Cys-380 des VP5 möglich. Ob diese Sequenzunterschiede zum breiten Zellspektrum des B223-Isolates beitragen, ist Gegenstand der momentanen Untersuchungen.

1.11 RETROVIREN

1.11.1 Virus der bovinen enzootischen Leukose (BLV)

Studien zur Verbesserung der Diagnostik von Infektionen mit dem Bovinen Leukosevirus

Beier, D.*, Teifke, J.P. und Vahlenkamp, T.W.

Die BLV-Infektion ist durch eine lange, klinische Latenzperiode gekennzeichnet, gefolgt durch die Entwicklung von Antikörpern gegen das BLV, dem Auftreten einer persistierenden Lymphozytose und der Ausbildung von Tumoren. Die Entwicklung des klinischen Krankheitsbildes ist unter anderem abhängig von der Höhe der infektiösen Dosis. Inwieweit auch BLV-Subtypen bei der Ausbildung der Präleukose, persistierenden Lymphozytose und dem Tumorstadium involviert sind, ist bisher nicht bekannt. Seit Jahrzehnten wird bei der serologischen Untersuchung auf Antikörper gegen das Bovine Leukosevirus zur Kalibrierung der Testkits das leukosepositive EU-Standardserum „E4“, (hergestellt vom *National Veterinary Laboratory Copenhagen, DK*), als Kontrollserum eingesetzt. Diese Serumkontrolle wurde vor Jahrzehnten aus einem Serumpool experimentell infizierter Rinder durch ein Tumorrind hergestellt und ist nur noch bedingt verfügbar. Das Serum findet seit einigen Jahren bereits in einer Verdünnung von 1/10 Verwendung und ist in dieser Form nicht mehr als Kontroll-Standard für den Agargel-Immuno-Diffusionstest (AGIDT) auf Grund des geringen Antikörpergehaltes gegen BLV geeignet. Der BLV-Serumsubtyp der Spender ist unbekannt.

Das Referenzlabor stellte ein neues Standardserum E 05 her, welches sich aus 24 Einzelseren aus vier europäischen Ländern und drei verschiedenen Subtypen zusammensetzt. Es wurde in einem nationalen Ringtest, an dem auch drei ELISA Testkit-Hersteller teilnahmen, sowie durch zwei internationale OIE Referenzlabors im Berichtszeitraum geprüft und ist im Ergebnis der Untersuchungen dem E4 in der Höhe des Antikörperspiegels überlegen.

Bei der Herstellung und Prüfung des neuen Standardserums wurden weitestgehend die durch das OIE in den *Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories* vorgegebenen Prüfkriterien berücksichtigt. Das E05 wird der OIE Standardkommission zum Einsatz als internationales Referenzserum zur Diagnostik der ERL vorgeschlagen.

Beim Nachweis des BLV-Provirus mit Hilfe der RT-PCR konzentrierten sich unsere Untersuchungen auf den stark konservierten *env* Abschnitt. Bei diesen Studien sollte eine Methode entwickelt werden, die zuverlässig den Nachweis des Provirus ermöglicht. Dazu wurde die RNA aus peripheren mononukleären Blutzellen, aus Lymphozyten nach einer Kurzzeitkultur sowie aus dem Zellkulturüberstand gewonnen. Diese RNA wurde mittels einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Erste Ergebnisse dieses Versuches führten zu positiven diagnostischen Ergebnissen bei infizierten, auch bei schwach positiven, Tieren. Die höchste Sensitivität ergab sich bei RNA aus den Zellen nach der Kurzzeitkultur. Zurzeit werden verschiedenste Primerkombinationen für eine *real time* PCR-Diagnostik getestet und die dazu entsprechenden DNA-Standards entwickelt. Dies ermöglicht einen quantitativen Vergleich der oben beschriebenen Methoden im Hinblick auf die Einschätzung der Sensitivität.

Pathogenetische Langzeitstudien an natürlich und experimentell mit BLV infizierten Rindern und Schafen

Beier, D. und Teifke, J.P.*

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

Mit Hilfe eines Infektionsversuches an Schafen, denen die verschiedensten BLV-Subtypen in kleinster infektiöser Dosis von Spenderrindern verabreicht wurden, konnten die Studien zur Infektiosität und zur Tumorbildung des BLV intensiviert werden. Im Berichtszeitraum erkrankten sechs Schafe. Vier Tiere zeigten hämatologische Auffälligkeiten mit hochgradiger Lymphozytose, zwei Tiere waren anorektisch und apathisch und wiesen Bewegungsstörungen auf bis hin zum Festliegen. Alle Tiere wurden pathologisch-anatomisch und histopathologisch untersucht. Bei der Sektion zeigten fünf Schafe das Bild der tumorösen Leukose mit multizentrischen, wenig differenzierten Lymphosarkomen vom B-Zelltyp in verschiedenen Körperlymphknoten, Leber, Milz, Herz und der Harnblasenwand. Bei einem Tier lag im Bereich der Brustwirbelsäule ein in den Wirbelkanal infiltrierender und das Rückenmark komprimierender lymphatisch-leukotischer Tumor vor. Von allen neoplastisch veränderten Organen wurden Gewebs-

proben zum Provirusnachweis mittels molekularbiologischer Methoden und als Referenzmaterial für die Diagnostik aufbewahrt.

1.11.2 Virus der Caprinen Arthritis-Encephalitis (CAEV)

Maedi/Visna Virus (MVV) und Virus der Caprinen Arthritis-Encephalitis (CAE)

Beier, D.*, Junghans, D.

Das Krankheitsbild der Maedi-Erkrankung beim Schaf ist gekennzeichnet durch eine langsam fortschreitende progressive Pneumonie (OPP) bei meist älteren Mutterschafen, geprägt durch Atemstörungen, Husten und Nasenausfluss bei physiologischer Körpertemperatur. Auslöser ist eine Infektion mit dem Maedi/Visna Virus (MVV). Nach einer Krankheitsdauer von mehreren Monaten, die mit fortschreitender Abmagerung einhergeht, endet diese Erkrankungsform immer tödlich.

MVV induziert die Bildung von neutralisierenden und präzipitierenden Antikörpern, die lebenslang in üblichen und kommerziell erhältlichen Testsystemen (AGIDT, mono/biphasischer ELISA, IFT) nachweisbar sind. Bei der Anwendung des AGIDT werden präzipitierende Antikörper gegen die viralen Glykoproteine p28 und/oder gp135 nachgewiesen. Der ELISA dient zum Nachweis von Antikörpern gegen MVV sowohl aus dem Blutserum als auch aus der Milch, letzterer mit geringerer Sensitivität. Der Nachweis der Erkrankung erfolgt pathohistologisch in Verbindung mit dem direkten Virusnachweis durch Kokultivierung von infizierten Makrophagen und Monozyten mit ovinen Fibroblastenzellkulturen (Plexus-Chorioideus-Zellen). Das Auftreten eines CPE vom Typ I (mit Riesenzellbildung) ist pathognomonisch. Die Anwendung der PCR, des Southern blot und der *In-situ*-Hybridisierung ist in spezialisierten Forschungslabors möglich, aber nicht paxisrelevant (OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2000).

Die Krankheitsform wird durch ein zellgebundenes ovines Lentivirus verursacht, welches nach Sequenzanalysen große phylogenetische Gemeinsamkeiten zum CAEV der Ziegen aufweist. Die genetischen Unterschiede zwischen MVV und CAEV betreffen vor allem das kodierende Gen für das Oberflächenglykoprotein gp 135. Die Erregerübertragung erfolgt über Kolostrum oder Milch infizierter Mütter auf Lämmer; die intrauterine Infektion wird nicht ausgeschlossen. Eine Therapie ist nicht möglich. Prophylaktisch ist die mutterlose Lämmeraufzucht in Reagentenbeständen angeraten.

Die Voraussetzung für die Feststellung eines Krankheitsfalles ist das Auftreten von klinischen Symptomen in Verbindung mit einer labordiagnostisch nachgewiesenen Infektion und einem epidemiologischen Zusammenhang (Tierkontakt, unkontrollierter Zukauf von Reagenten)

Die Meldepflicht beim Auftreten von Maedi bei Schafen ist in der „Neufassung der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten“ vom 11.04.2002 (BGBl. I, Seite 540) vorgegeben.

In den einzelnen Bundesländern gelten darüber hinaus die jeweiligen Zuständigkeitsregelungen für die Durchführung der Vorschriften der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten (Melde-VO) vom 09.08.1983 (BGBl. I, Seite 1095).

1.12 POCKENVIREN

1.12.1 Parapockenviren (PPV)

Rziha, H.-J.*, Schöffler, P., Nebrich, S. und Stitz, L.

Der neue Orf Virus (ORFV, Genus Parapoxvirus) Vektor wurde in den folgenden Teilprojekten weiter untersucht, insbesondere die Induktion protektiver Immunabwehr mittels verschiedener Rekombinanten des attenuierten ORFV-Stammes D11701-V sowie dessen fehlende Vermehrungsfähigkeit in nicht-permissiven Wirtszellen.

Herpesvirus Glykoprotein exprimierende Rekombinanten

Die beschriebenen Rekombinanten D1701-VrVgC und D1701-VrVgD exprimieren die Glykoproteine gC und gD des Pseudorabiesvirus (PrV) in ORFV permissiven und nicht-permissiven Zellen und vermitteln in verschiedenen Mäusestämmen einen Schutz gegen letale PrV-Infektion. Die im Rahmen eines EU-Projektes durchgeführten Immunisierungsversuche von Schweinen, dem natürlichen Wirt des PrV,

ergaben bisher sehr viel versprechende Ergebnisse. In einer Versuchsserie wurden Schweine mit gC- und gD-pSindbis-DNA-Plasmiden und den ORFV-Rekombinanten durch „prime-boost“ Vakzinierung immunisiert. Nach letaler Belastungsinfektion mit dem virulenten PrV-Stamm NIA3 waren alle vakzinierten Schweine ausgezeichnet gegen die Aujeszky'sche Krankheit geschützt, vergleichbar einer Immunisierung mit konventionellem Lebendimpfstoff. Ähnlich den im Mausmodell erhaltenen Ergebnissen besaßen die vakzinierten Tiere bereits zwei Tage vor der Belastungsinfektion eine sehr gute humorale und Zell-vermittelte Immunität gegen PrV. Die ausgeschiedenen Virusmengen nach der Belastungsinfektion waren verglichen mit nicht oder nur DNA vakzinierten Tieren so stark reduziert, dass das Risiko einer Kontaktinfektion nicht geschützter älterer Schweine höchst unwahrscheinlich ist. In einer anderen Versuchsserie wurden schließlich verschiedene „prime-boost“ Kombinationen der ORFV-Rekombinanten und gC-/gD-DNA untersucht. Noch ausstehende Testergebnisse sollen die wirksamste Immunisierungsstrategie für Schweine gegen letale PrV-Infektion zeigen.

Borna disease Virus (BDV) ORFV Rekombinante

Ratten, die ebenfalls für ORFV nicht-permissiv sind, stellen ein ausgezeichnetes Modell der BDV-Infektion und der T-Zell-vermittelten Neuropathogenese dar. Immunisierung mit der Rekombinanten D1701-VrVp40, die das Hauptimmunogen p40 des BDV exprimiert, schützt die Tiere komplett gegen die neurologische Erkrankung nach intracranialer Belastungsinfektion und führt auch zu einer Eliminierung des persistierenden BDV aus dem Gehirn der immunisierten Ratten. Die Wirksamkeit der D1701-VrVp40 Immunisierung konnte jetzt auch nach Aerosolinfektion, der natürlichen BDV-Infektionsroute, gezeigt werden. Dieser Schutz war selbst acht Monate nach der letzten Vakzination oder nach einer erneuten Immunisierung, die vierzehn Monate nach der ersten Immunisierung erfolgte, wirksam. Die verschiedenen immunisierten Ratten werden nur bis zu elf Monaten nach der Belastungsinfektion virologisch, serologisch und immunhistochemisch auf Anwesenheit des BDV untersucht.

Verlauf der ORFV Infektion in nicht-permissiven Zellen

ORFV Vektorvakzine induzieren eine exzellente, protektive Immunantwort in Wirten, die für ORFV nicht-permissiv sind. Die Ursachen der fehlenden Virusproduktion in solchen Wirtszellen sind bisher unbekannt. Erhaltene Ergebnisse deuten auf eine aberrante Virusreifung in diesen Zellen hin. Weiterhin zeigte sich, dass eine nicht-produktive ORFV-Infektion von verschiedenen Zelllinien und primären Fibroblasten der Maus sehr schnell zur Induktion von Apoptose führt. Inhibition an der Apoptose beteiligter Caspasen führt nicht zur Virusproduktion. Die frühe ORFV-Genexpression induziert Signalkaskaden des ER-Stress. Um zu prüfen, inwieweit diese Ergebnisse *in vivo* relevant sind, wurden Mäuse intramuskulär mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten immunisiert, der Muskel präpariert und Dünnschnitte mittels Immunhistochemie, X-Gal-Färbung und Elektronenmikroskopie analysiert. Bis mindestens sechs Tage nach der Immunisierung ließ sich eine lokale Fremdgenexpression im Muskel nachweisen, u.a. in Makrophagen-ähnlichen Zellen. Elektronenmikroskopie der Muskeldünnschnitte zeigte die Anwesenheit unreifer Viruspartikel mit anormaler Morphologie in möglicherweise apoptotischen Zellen. Weitere Studien müssen den Zelltyp charakterisieren, der ORFV aufnimmt und Fremdantigen präsentiert.

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, die als *Ankyrin repeats* bezeichnet werden. Diese ANK-Motive sind weit verbreitet und essentiell für verschiedenste Protein-Protein Wechselwirkungen bei der Regulation von Transkription, Apoptose, Immunantwort, Zellzyklus oder Proteintransport. In Zusammenarbeit mit der Universität Gdansk wurden die drei Ank-Gene des ORFV D1701-V exprimiert, gereinigt und zur Herstellung spezifischer Antikörper eingesetzt. Weiterhin wurden verschiedene Fusionen der Ank-Gene mit dem EGFP (*enhanced green fluorescence protein*) Gen konstruiert, um nach Transfektion deren Lokalisation in der Zelle Fluoreszenz-mikroskopisch zu untersuchen. Konfokale Mikroskopie zeigte bisher die Assoziation eines Ank-Genproduktes mit den Mitochondrien, während ein zweites Ank-Genprodukt in den Zellkern wandert. Die weiteren Untersuchungen sollen zelluläres Protein als Bindungspartner identifizieren, um so auf die mögliche Funktion der ORFV Ank-Gene in der infizierten Zelle schließen zu können.

1.13 PAPILLOMAVIREN

Etablierung und Charakterisierung einer Zellkultur zur Untersuchung der Pathogenese des equinen Sarkoids

von Felbert, I., Riebe, R. und Teifke, J.P.*

(in Zusammenarbeit mit Hertsch, B. [Pferdeklinik der Freien Universität Berlin]; Scheidemann, W. [Tierklinik Hochmoor]; Anders, K. [Pferdeklinik Demmin] und Kussmann, S. [Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza])

Eine Infektion mit bovinen Papillomviren (BPV) der Typen 1 und 2 gilt heute als die wichtigste Ursache für die Ausbildung von equinen Sarkoiden, den häufigsten Hauttumoren von Pferden.

Mittels überlappender PCR und anschließender DNA-Sequenzierung konnte in Verbindung mit *In-situ*-Hybridisierung erstmals gezeigt werden, dass sich das komplette BPV-1 Genom mit einer Übereinstimmung von 98,8 % in den mesenchymalen Tumorzellen befindet.

Weiterhin wurden aus mehreren equinen Sarkoiden insgesamt vier primäre Zellkulturen etabliert. Die spindelförmig elongierten Tumorzellen zeigten *in vitro* alle während der ersten 15 Passagen ein charakteristisches ungeordnetes Wachstum. In den folgenden Passagen änderte sich das Wachstumsverhalten. Die Zellen wuchsen in vorzugsweise paralleler Ausrichtung in einem geordneten Monolayer und gingen schließlich ab der 22. Passage in die Seneszenz über. Im Gegensatz dazu zeigten mitgeführte normale equine Fibroblasten von der ersten Passage an ein für Fibroblasten typisches fischzugartiges Wachstumsmuster. Immunzytologisch konnte nur in einzelnen fibroblastenähnlichen Tumorzellen ein schwaches Signal für Vimentin gezeigt werden, wohingegen unveränderte Fibroblasten kräftig positiv reagierten. Dieses Bild entsprach den immunhistologischen Befunden am Paraffinschnitt. Dort fand sich in verschiedenen equinen Sarkoiden ein positives Vimentinsignal in max. 50 % der Zellen, hauptsächlich im Bereich des dermoepidermalen Überganges. Sowohl die kultivierten Tumorzellen als auch die normalen Fibroblasten waren negativ für Zytokeratin, GFAP, S100, NSE und Desmin.

Es war über maximal 20 Zellkulturpassagen möglich, mittels PCR und Southern Blot nicht-integrierte BPV-1 DNA in den kultivierten Tumorzellen oder in deren Zellkulturüberstand nachzuweisen. Im Gegensatz dazu reagierten die normalen Fibroblasten negativ.

Der Einfluss des Phosphatase-and-Tensin-homologue (PTEN) auf die Pathogenese des equinen Sarkoids wurde immunhistologisch am Paraffinschnitt untersucht. Während alle Tumoren in unterschiedlichen Anteilen in den mesenchymalen Tumorzellen und ein Tumor zusätzlich auch in den epithelialen Zellen positive Signale zeigten, war es in normaler Haut nicht möglich, eine PTEN-Expression nachzuweisen.

1.14 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 Aujeszky'sche 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 Marek'sche 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.

1.14.1 Untersuchungen zur Molekularbiologie animaler Herpesviren

1.14.1.1 Virus der infektiösen Laryngotracheitis der Hühner (ILTV)

Evaluierung Influenzavirus-Hämagglutinin exprimierender ILTV-Rekombinanten als potentielle Markerimpfstoffe gegen die klassische Geflügelpest

Wiesner, D., Veits, J., Starick, E., Köllner, B., Teifke, J.P. und Fuchs, W.*

(in Zusammenarbeit mit P. Stacheli, Universität Freiburg, und B. Kaspers, LMU München)

Das ILTV ist ein Alphaherpesvirus, das eine weltweit auftretende Atemwegserkrankung der Hühner verursacht, die Wachstum und Legeleistung beeinträchtigt und abhängig von der Virulenz des Erregers in 5 – 70 % der Fälle tödlich verläuft. Zur Bekämpfung der infektiösen Laryngotracheitis (ILT) können die Tiere prophylaktisch mit abgeschwächten Lebendvirus-Impfstoffen immunisiert werden, die einfach und kostengünstig entweder okulär oder auch über Aerosol und Trinkwasser verabreicht werden können. Leider sind die bislang eingesetzten ILTV Impfstämme genetisch nicht charakterisiert und weisen häufig eine gewisse Restvirulenz auf, die sich während der Tierpassage weiter steigern und zur Erkrankung der Impflinge und ungeimpfter Kontakttiere führen kann. Allerdings gelang es uns und anderen in den letzten Jahren mit Hilfe gentechnischer Methoden rekombinante ILT-Viren herzustellen, aus deren Genomen wichtige Virulenzgene irreversibel entfernt worden waren und die deshalb für Hühner nahezu apathogen sind (siehe Jahresbericht 2001, S. 29-35). Solche ILT-Impfviren könnten auch als Vektoren für die Expression immunogener Proteine anderer Krankheitserreger des Geflügels genutzt und dann als multivalente Vakzinen eingesetzt werden. Deshalb wurden von uns unter anderem die Hämagglutinin-Gene der Typen H5 und H7 aus hochpathogenen aviären Influenzaviren (HPAIV) in das ILTV-Genom integriert. Da die schützende Immunität gegen die durch HPAIV verursachte klassische Geflügelpest auf Hämagglutinin-spezifischen Antikörpern beruht, wurde außerdem das Gen eines Aktivierungsfaktors für die Antikörper-produzierenden B-Zellen des Huhnes (chBAFF) in das ILTV-Genom eingefügt (siehe Jahresbericht 2002, S. 143-144). *In-vitro*-Studien zeigten, dass sowohl die H5 oder H7 Proteine als auch chBAFF in mit den entsprechenden ILTV-Rekombinanten infizierten Zellen abundant exprimiert werden. Wie gewünscht wurde chBAFF aus den Zellen freigesetzt und konnte im Kulturüberstand in biologisch aktiver Form nachgewiesen werden.

Zur Verifizierung früherer Tierexperimente wurden im vergangenen Jahr erneut zwei Gruppen von je 20 Hühnern mit ILTV-Mutanten infiziert, denen das Virulenzgen UL0 fehlte und die stattdessen das H7-Hämagglutinin eines italienischen HPAIV Isolates aus dem Jahre 1999 exprimierten. Das für eine der Tiergruppen eingesetzte ILT-Virus produzierte zusätzlich chBAFF. Obwohl die Immunisierung mit einer hohen Dosis von ca. 10^5 infektiösen Einheiten pro Tier erfolgte, erkrankten die Hühner nicht und schieden auch kein infektiöses Impfvirus in nachweisbaren Mengen aus. Durchflusszytometrische Analysen des Blutes zeigten in den ersten Tagen nach Immunisierung einen vorübergehenden Abfall der B- und T-Zelldichte und nach zwei Wochen waren in den Seren fast aller Tiere sowohl ILTV- als auch Hämagglutinin-spezifische Antikörper nachweisbar. Allerdings konnte kein signifikanter Einfluss der chBAFF-Expression auf Antikörpertiter und Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation festgestellt werden. Lediglich die Milz als Ort der Lymphozytenvermehrung erschien bei seziierten Tieren aus der chBAFF-positiven Gruppe geringfügig vergrößert. Alle geimpften Hühner überlebten anschließende Belastungsinfektionen mit virulentem ILTV und HPAIV, während mit gleichen Virusdosen infizierte Kontrolltiere im Falle von ILTV zu 44 % und im Falle von AIV zu 100 % verendeten. Bei den geschützten Tieren verursachte die Belastung mit ILTV keine und die mit HPAIV nur sehr milde klinische

Symptome, was gegenüber früheren Versuchen mit niedrigeren Impfdosen eine deutliche Verbesserung darstellte. Wiederum zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den mit chBAFF-positiven oder -negativen ILTV-Mutanten immunisierten Tieren. Offensichtlich ist also dieses Zytokin in den produzierten Mengen nicht in der Lage, die durch eine ILTV-Infektion induzierte Immunantwort weiter zu verstärken. Dessen ungeachtet konnten wir aber erneut bestätigen, dass stabil attenuierte ILTV-Rekombinaten bzw. Vektoren in ausreichend hohen Dosen einen zuverlässigen Impfschutz gegen virulente Stämme und andere Geflügelpathogene vermitteln können.

Anders als die bisher zur Eindämmung der Geflügelpest teilweise eingesetzten inaktivierten Influenzaviren würden die von uns hergestellten Hämagglutinin-exprimierenden ILTV-Vektorimpfstoffe ebenso wie einige andere rekombinante Vakzinen eine serologische Unterscheidung zwischen geimpften und mit Influenza-Feldviren infizierten Tieren ermöglichen (DIVA-Strategie). Um dies zu zeigen, wurden die Seren unserer Versuchstiere am Hause entwickelten ELISA-Tests unterzogen, welche das relativ hochkonservierte Nukleoprotein von Influenza A Viren als Zielantigen nutzen. Nach Immunisierung mit den ILTV-Rekombinanten verliefen diese Tests erwartungsgemäß negativ, da ausschließlich Hämagglutinin-spezifische Antikörper induziert wurden. Nach anschließender Belastungsinfektion mit HPAIV war dagegen in fast allen Tieren trotz des klinisch unauffälligen Verlaufes die zusätzliche Induktion Nukleoprotein-spezifischer Antikörper eindeutig nachweisbar. Dieser Vorzug unserer Hämagglutinin-exprimierenden ILTV-Mutanten würde die Risiken einer Notfall-Vakzination gefährdeter Geflügelbestände im Falle naher Geflügelpestausbüche minimieren, da ein Eindringen der Erreger oder auch anderer aviärer Influenzaviren in die geimpften Bestände weiterhin diagnostizierbar bliebe.

Bislang stehen uns ILTV-Vektoren für die H7- und H5-Hämagglutinine italienischer HPAIV-Isolate von 1999 bzw. 1998 zur Verfügung. Da letzteres in seiner Aminosäuresequenz nur ca. 93 % Übereinstimmung mit dem der zurzeit in Asien und Südosteuropa auftretenden H5N1 Viren aufweist, könnte der gegen die neuen Erreger erreichbare Impfschutz unter Umständen nicht ausreichend sein. Deshalb wurde mittlerweile auch das H5-Gen eines aktuellen HPAIV-Isolates aus Vietnam kloniert und soll nun an Stelle der als Virulenzfaktoren bekannten UL0- und gJ-Proteine im ILTV-Genom exprimiert werden.

1.14.1.2 Koi Herpesvirus (KHV)

Herstellung rekombinanter Koi Herpesviren

Rosenkranz, D., Fichtner, D., Bergmann, S. und Fuchs., W.*

Seit einigen Jahren tritt in Koi- und Karpfenzuchtbetrieben auf der ganzen Welt eine häufig tödlich verlaufende Infektionskrankheit auf, als deren Erreger ein vorher nicht bekanntes Herpesvirus identifiziert wurde, das als KHV, *carp nephritis and gill necrosis virus* (CNGV), oder *cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3) bezeichnet wird. Das über 290 kbp große, doppelsträngige DNA-Genom des KHV wurde angeblich bereits vollständig sequenziert, allerdings ist bislang nur ein kleiner Teil der Resultate publiziert. Auch am FLI wurden wie berichtet große Teile des KHV-Genoms kloniert und monoklonale Antikörper sowie monospezifische Antiseren gegen immunogene Virusproteine hergestellt (siehe Jahresbericht 2004, S. 37-48).

Im Hinblick auf die funktionelle Charakterisierung viraler Gene und die Entwicklung sicherer Impfstoffe wurde außerdem damit begonnen, mit gentechnischen Methoden rekombinante Koi Herpesviren herzustellen. In einem ersten Versuch wurde eine Expressionskassette für das grün fluoreszierende Protein (GFP) in das Gen der viralen Thymidinkinase (TK) von KHV inseriert, welches dadurch inaktiviert wurde (siehe Jahresbericht 2004, S. 130). Aufgrund des Vorhandenseins funktionell homologer Wirtsenzyme hatte die TK-Deletion wie bei den meisten bislang untersuchten Herpesviren auch bei KHV keine signifikanten Auswirkungen auf die Virusvermehrung in Zellkultur. Allerdings erwiesen sich TK-negative Herpesviren *in vivo* häufig als attenuiert, weshalb nun geprüft werden soll, ob auch unsere KHV-Rekombinante als Lebendvirus-Vakzine für Karpfen und Kois geeignet sein könnte.

Da sich das TK-Gen als nicht essentiell für die Replikation von KHV erwiesen hat, wurde an dieser Stelle mittlerweile auch ein Mini-F Plasmidvektor inseriert, der die Vermehrung des KHV-Genoms als artifizielles Bakterienchromosom (BAC) in *E. coli* ermöglichen soll. In den bislang verfügbaren Fischzellkulturen kann das KHV nur relativ ineffizient vermehrt werden, sodass die Verfügbarkeit eines solchen BAC die Herstellung weiterer Virusrekombinanten wesentlich erleichtern würde, zumal mittlerweile zahlreiche Techniken für die gezielte Mutagenese klonierter DNA in *E. coli* etabliert wurden. Leider gelang es uns aber bislang nicht, durch Transformation das vollständige KHV-Genom in die Bakterien einzubringen

und nach anschließender Transfektion permissiver Karpfenzellen mit der klonierten Plasmid-DNA infektiöse Viren zu rekonstituieren.

Außerdem wurde versucht, eine KHV-Rekombinante zu isolieren, der ein immunogenes virales Hüllprotein (ORF4-Protein) fehlt, welches wir mit Hilfe eines monospezifischen Kaninchenserums identifiziert hatten. Einige herpesvirale Hüllproteine haben essentielle Funktionen bei der Rezeptorvermittelten Bindung und Penetration der Wirtszellen. Eine ähnlich wichtige Funktion könnte auch dem ORF4-Protein von KHV zukommen, da nach Transfektion KHV-infizierter Zellen mit einem Transferplasmid, in dem ORF4 durch eine GFP-Expressions-kassette substituiert worden war, zwar Viren erhalten wurden, die grün fluoreszierende Plaques bildeten, jedoch nicht zu homogenen Populationen gereinigt werden konnten. Deshalb wurden rekombinante Karpfenzelllinien hergestellt, in deren Genom das ORF4-Gen stabil integriert ist und unter Kontrolle eines starken heterologen Promotors (HCMV-IE) exprimiert wird. Nun kann geprüft werden, ob diese Zellen den Replikationsdefekt ORF4-negativer Koi Herpesviren *in trans* komplementieren.

1.14.1.3 Pseudorabies Virus (PrV)

2D-elektrophoretische Kartierung und Quantifizierung der Strukturkomponenten des Pseudorabies Virus

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

Proteine des Tegumentes unterliegen einer Vielzahl von Wechselwirkungen mit anderen Strukturkomponenten des Viruspartikels und spielen deshalb bei der Virusmorphogenese eine herausragende Rolle. Die Deletion einzelner Tegumentproteine könnte deshalb in der Folge zu weitergehenden Veränderungen der Zusammensetzung des Viruspartikels führen. Zur massenanalytischen Quantifizierung der Strukturproteine des PrV wurde das SILAC-Verfahren (*stable isotope labelling with amino acids in cell culture*) adaptiert. Ausgangsmaterial waren hoch gereinigte Viruspräparationen der zu untersuchenden Mutanten und des PrV Wildtyps, wobei die letzteren metabolisch massenmarkiert vorlagen. Nach Standardisierung der Proteinextrakte aus den mutanten Virionen durch den Wildtyp Extrakt wurden die einzelnen Proteine nach ein- oder zweidimensionaler Elektrophorese massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. In einer exemplarischen Studie wurden die Auswirkungen der Deletion der Tegumentproteine US3, UL47 und UL49 sowie des Hüllproteins Glykoprotein E auf die Zusammensetzung der Viruspartikel untersucht. Während für Kapsidbestandteile und kapsidassoziierte Proteine (UL25, UL38) streng stöchiometrische Mengenverhältnisse zum Hauptkapsidprotein gefunden wurden, war das nur für einen Teil der Tegumentproteine (UL36, UL47) und ein Hüllprotein (Glykoprotein H) zu beobachten. Die relativen Mengen anderer Tegumentproteine (UL46, UL49, UL48) und des Aktin zeigten zum Teil erhebliche Mengenabweichungen im Vergleich zu Wildtyp Virionen. So enthalten Glykoprotein E-negative Partikel im Vergleich zu Wildtyp Partikeln nur etwa 50 % des UL49, was durch eine bereits beschriebene Wechselwirkung dieser beiden Proteine und der Rekrutierung des UL49 durch das Glykoprotein E erklärbar wäre. Deletionen von US3, UL47 oder UL49 führten in jedem Fall zu einer kompensatorischen Akkumulation von zellulärem Aktin im Viruspartikel, die bisher nur bei einer UL49-negativen Mutante beschrieben war.

In laufenden Studien mit anderen Deletionsmutanten ergaben sich weitere interessante Ansatzpunkte. So zeigte sich, dass das essentielle UL36 Protein in den meisten Tegumentprotein-Deletionsmutanten (UL13, UL41, UL47, UL51) in stöchiometrischen Verhältnissen zum Hauptkapsidprotein eingebaut wird. Dagegen traten in Deletionsmutanten des UL11 und des UL16 bisher unbekannte Prozessierungsprodukte des UL36 und damit einhergehend Minderungen des vollständigen UL36 Proteines auf. In einer UL21-Deletionsmutante wurde ein fast vollständiger Verlust des UL49 Proteines beobachtet. Die genannten Untersuchungen dienen somit nicht nur der Aufklärung von Protein-Protein Interaktionen bei der Morphogenese von Pr-Virionen, sondern tragen auch zur Kenntnis der Struktur des Teguments bei und ermöglichen eine kritische Einschätzung der Phänotypen von Deletionsmutanten durch das Aufzeigen von sekundären Mengenveränderungen im Viruspartikel.

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des UL35 Proteins

Krautwald, M., Wiesner, D. und Fuchs, W.*

Die homologen UL35-Gene von PrV und HSV-1 kodieren für Kapsidkomponenten, die als GFP-Fusionsproteine exprimiert und so zur *in vivo* Fluoreszenz-Markierung von Viruspartikeln genutzt werden können (siehe Jahresbericht 2004, S. 133-134). Allerdings ist über die biologische Funktion von UL35 selbst bislang nur wenig bekannt. Deshalb wurde ein monospezifisches Kaninchenantiserum gegen ein bakterielles Fusionsprotein hergestellt, das erstmals den direkten Nachweis des ca. 11,5 kDa großen, nativen UL35-Genproduktes von PrV erlaubte. Außerdem wurden durch Mutagenese des als artifizielles Bakterienchromosom (BAC) klonierten PrV-Genoms eine UL35-Deletionsmutante und eine entsprechende Revertante hergestellt. Replikationsstudien mit diesen Viren zeigten, dass UL35 nicht essentiell für die Virusvermehrung in RK13-Zellkulturen ist, seine Deletion aber zu einer Reduktion der Plaquedurchmesser um ca. 30 % und der maximalen Virustiter um ca. 90% führt. Interessanterweise wies eine PrV-Mutante, die das UL35-GFP Fusionsprotein exprimierte, sehr ähnliche Wachstumsdefekte auf, was darauf hindeutet, dass diese Proteinvariante zwar in Virionen eingebaut wird, aber nicht funktionell ist. Deshalb könnten die bislang mit UL35-GFP-markierten PrV und HSV-1 Nukleokapsiden erzielten Ergebnisse möglicherweise nicht in jeder Hinsicht repräsentativ für die entsprechenden Wildtypviren sein.

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der UL32 und UL33 Genprodukte

Fuchs, W., Klupp, B., Granzow, H. und Mundt, E.*

Die Produkte der benachbarten UL32 und UL33 Gene des PrV wurden (ebenfalls) mit Hilfe gegen bakterielle Fusionsproteine hergestellter, monospezifischer Kaninchen-Seren identifiziert. Die offensichtlich nur in geringen Mengen exprimierten, ca. 52 kDa (UL32) und 12,5 kDa (UL33) großen Proteine konnten in infizierten Zellen, aber nicht in gereinigten Virionen nachgewiesen werden. In transfizierten Zellen, welche UL32 oder UL33 transient überexprimierten, wurden durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie Akkumulationen beider Proteine in diskreten Kerndomänen festgestellt, was auf Funktionen in frühen Stadien der Virusvermehrung hindeutete. Dies konnte durch die Herstellung UL32- bzw. UL33-negativer PrV-Mutanten bestätigt werden, die zwar noch zur Replikation viraler DNA befähigt waren, diese aber nicht zu monomeren Genomen spalten und in die vorgeformten Kapside verpacken konnten. Elektronenmikroskopische Studien zeigten darüber hinaus, dass in Abwesenheit von UL32 oder UL33 spätere Schritte der Virusmorphogenese, wie die primäre Umhüllung von Kapsiden an der inneren Kernmembran, oder die Freisetzung in der trans-Golgi Region des Zytoplasmas umhüllter Tegument-Aggregate (L-Partikel) nicht inhibiert waren. Infektiöse Virionen oder Virusplaques wurden jedoch nur in trans-komplementierenden Zelllinien gebildet, die das Produkt des aus dem Virusgenom deletierten Gens konstitutiv exprimierten. Diese Resultate stehen im Einklang mit denen früherer Studien an HSV-1 und bestätigen die essentiellen Funktionen der innerhalb der *Herpesviridae* konservierten UL32 und UL33 Proteine bei Spaltung und Verpackung des Virusgenoms.

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

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

Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems konnten wir in der Vergangenheit verschiedene physikalische Interaktionen zwischen PrV-Proteinen aufzeigen, die für die primäre Umhüllung von Nukleokapsiden an der Kernmembran sowie für deren Tegumentierung und sekundäre Umhüllung im Zytoplasma relevant sein dürften (siehe Jahresbericht 2002, S. 21-31). Im vergangenen Jahr wurden diese Studien durch Einbeziehung der vermutlich an Spaltung und Verpackung des Virusgenoms beteiligten UL6, UL17, UL25, UL32 und UL33 Genprodukte auf frühere Schritte der Virusmorphogenese ausgeweitet. Unmittelbare Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen selbst konnten bislang nicht festgestellt werden, doch zeigten sowohl das UL6- als auch das UL32-Genprodukt reproduzierbare Interaktionen mit dem carboxy-terminalen Abschnitt eines als Regulator der viralen Transkription beschriebenen Proteins (EP0). Für das UL33-Genprodukt wurden dagegen Wechselwirkungen mit überlappenden Abschnitten des UL8-Proteins gefunden, das als Komponente des Helikase-Primase-Komplexes an der viralen DNA-Replikation beteiligt ist. Obwohl alle genannten Proteine im Kern PrV-infizierter Zellen lokalisiert sind und aufgrund ihrer Funktionen direkt oder indirekt an das Virusgenom binden müssen, bleibt die biologische Relevanz

der im artifiziellen Hefe-System gefundenen Interaktionen zu prüfen, zumal EP0 im Gegensatz zu den anderen Genprodukten nicht essentiell für die produktive Virusreplikation ist.

Ein zweiter neuer Aspekt unserer Arbeit ist die Untersuchung von Interaktionen viraler Genprodukte mit zellulären Proteinen, die für den intrazytoplasmatischen Transport von eindringenden oder reifenden Virionen notwendig sein könnten. Offensichtlich bewegen sich die mit wenigen Tegumentproteinen, darunter den UL36 und UL37 Genprodukten, assoziierten Nukleokapside mit Hilfe zellulärer Motorproteine entlang von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Deshalb werden die beiden genannten PrV-Proteine zurzeit im Hefe-2-Hybridsystem auf Interaktionen mit Proteinen einer cDNA-Expressionsbibliothek aus Mäusezellen untersucht. Da für HSV-1 in ähnlichen Studien Interaktionen des UL35-Kapsidproteins mit Komponenten des Motorproteinkomplexes Dynein gefunden worden waren, wurde auch das homologe Genprodukt von PrV in die Experimente einbezogen. Bislang konnten jedoch keine entsprechenden Interaktionen des UL35 Proteins von PrV festgestellt werden und auch die moderaten Replikationsdefekte einer UL35-negativen PrV-Mutante (s.o.) sprechen gegen eine zentrale Rolle des Proteins bei Viruseintritt oder -freisetzung. Die UL36 und UL37 Proteine von PrV zeigten dagegen reproduzierbare Wechselwirkungen mit überlappenden Expressionsprodukten einiger zellulärer Gene, deren genaue Funktionen allerdings unbekannt sind. Deshalb ist noch unklar, ob und bei welchen Schritten des viralen Replikationszyklus die festgestellten Proteininteraktionen relevant sind.

1.14.2 Untersuchung der Funktionen viraler Protein bei Morphogenese und Freisetzung von Herpesviren

Böttcher, S., Fuchs, W., Gentner, S., Granzow, H., Karger, A., Keil, G.M., Klupp, B.G., Krautwald, M., Michael, K., Wiesner, D. und Mettenleiter, T.C.*

Herpesviren kodieren für mehr als 70 virale Proteine, von denen etwa die Hälfte Strukturkomponenten viraler Partikel darstellen. Die Analyse der molekularen Grundlagen für den Zusammenbau dieser außerordentlich komplexen Virusstruktur beinhaltet die funktionelle Charakterisierung der an der Morphogenese und Freisetzung von Herpesviren beteiligten Proteine, wobei insbesondere die Aufklärung innerhalb der Herpesviren konservierter Prozesse und Prozesspartner im Vordergrund steht. Diese grundlegenden Untersuchungen zum Verständnis der Herpesvireninfektionen könnten neue Möglichkeiten der Prävention, Bekämpfung und Therapie herpesviraler Erkrankungen eröffnen, die nicht nur für die Veterinärmedizin bedeutsam sind. Im Rahmen dieses Projekts sollen beispielhaft am Pseudorabies Virus, dem Erreger der Aujeszky'schen Krankheit des Schweins, in einer konzertierten Aktion funktionelle Analysen möglichst aller viralen Gene und Genprodukte in einem standardisierten Ansatz unter Verwendung isogener Mutanten untersucht werden. Hinsichtlich früherer Ergebnisse wird auf die vorherigen Jahresberichte verwiesen. Im Berichtszeitraum konnten die folgenden Resultate erzielt werden:

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des UL35 Proteins

Die homologen UL35-Gene von PrV und HSV-1 codieren für Kapsidkomponenten, die als GFP-Fusionsproteine exprimiert und so zur *in vivo* Fluoreszenz-Markierung von Viruspartikeln genutzt werden können (siehe Jahresbericht 2004, Seite 133-134). Allerdings ist über die biologische Funktion von UL35 selbst bislang nur wenig bekannt. Deshalb wurde ein monospezifisches Kaninchenantiserum gegen ein bakterielles Fusionsprotein hergestellt, das erstmals den direkten Nachweis des ca. 11,5 kDa großen, nativen UL35-Proteins von PrV erlaubte. Außerdem wurden durch Mutagenese des als artifizielles Bakterienchromosom (BAC) klonierten Virusgenoms eine UL35-Deletionsmutante und eine entsprechende Revertante hergestellt. Replikationsstudien mit diesen Viren zeigten, dass UL35 nicht essentiell für die Virusvermehrung in RK13-Zellkulturen ist, seine Deletion aber zu einer Reduktion der Plaquedurchmesser um ca. 30 % und der maximalen Virustiter um ca. 90 % führt. Interessanterweise wies eine PrV-Mutante, die das UL35-GFP Fusionsprotein exprimiert, sehr ähnliche Wachstumsdefizite auf, was darauf hindeutet, dass diese Proteinvariante zwar in Virionen eingebaut wird, aber nicht funktionell ist. Deshalb könnten die bislang mit UL35-GFP-markierten PrV und HSV-1 Nukleokapsiden erzielten Ergebnisse möglicherweise nicht in jeder Hinsicht repräsentativ für die entsprechenden Wildtypviren sein.

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der UL32 und UL33 Genprodukte

Die Produkte der benachbarten UL32 und UL33 Gene des PrV wurden mit Hilfe gegen bakterielle Fusionsproteine hergestellter, monospezifischer Kaninchen-Seren identifiziert. Die offensichtlich nur in geringen Mengen exprimierten, ca. 52 kDa (UL32) und 12,5 kDa (UL33) großen Proteine konnten in

infizierten Zellen, aber nicht in gereinigten Virionen nachgewiesen werden. In Plasmid-transfizierten Zellen, welche UL32 oder UL33 transient überexprimierten, wurden durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie Akkumulationen beider Proteine in diskreten Kerndomänen festgestellt, was auf Funktionen in frühen Stadien der Virusvermehrung hindeutete. Dies konnte durch die Herstellung UL32- bzw. UL33-negativer PrV-Mutanten bestätigt werden, die zwar noch zur Replikation viraler DNA befähigt waren, diese aber nicht zu monomeren Genomen spalten und in die vorgeformten Kapside verpacken konnten. Elektronenmikroskopische Studien zeigten darüber hinaus, dass in Abwesenheit von UL32 oder UL33 spätere Schritte der Virusmorphogenese, wie die primäre Umhüllung von Kapsiden an der inneren Kernmembran oder die Freisetzung umhüllter Tegument-Aggregate (L-Partikel) in der trans-Golgi Region nicht inhibiert waren. Infektiöse Virionen oder Virusplaques wurden jedoch nur in trans-komplementierenden Zelllinien gebildet, die das Produkt des aus dem Virusgenom deletierten Gens konstitutiv exprimierten. Diese Resultate stehen im Einklang mit denen früherer Studien an HSV-1 und bestätigen die essentiellen Funktionen der innerhalb der *Herpesviridae* konservierten UL32 und UL33 Proteine bei Spaltung und Verpackung des Virusgenoms.

Bedeutung des UL25 Proteins für die Freisetzung von Kapsiden aus dem Kern

Der Zusammenbau der Herpesvirus-Kapside und das Verpacken der viralen DNA erfolgt im Kern infizierter Zellen. Die virale DNA, die in Form langer *head-to-tail* Concatemere gebildet wird, wird dabei in Genomlänge prozessiert und in die vorgeformten Vorläufer-Kapside verpackt. Der Prozess der DNA-Spaltung (*cleavage*) ist dabei eng mit der Verpackung (*encapsidation*) gekoppelt und diese wiederum mit der Freisetzung aus dem Kern. Nur Kapside mit vollständig verpackter DNA, so genannte C-Kapside, werden effizient aus dem Kern ausgeschleust, wobei der Mechanismus noch unklar ist.

Bei HSV-1 werden sechs konservierte Genprodukte (UL6, UL15, UL17, UL28, UL32, UL33) für die Spaltung und Verpackung des Genoms benötigt. Bei PrV konnten die Genprodukte von UL6, UL28 (Mettenleiter et al., 1993), UL17 (siehe letzter Berichtszeitraum, Klupp et al., 2005), UL32 und UL33 (siehe unten) identifiziert und zumindest vorläufig charakterisiert werden. Mutanten in all diesen Genen zeigen einen ähnlichen Phänotyp: es werden zwar Vorläufer-Kapside gebildet, aber die konkatemere DNA wird nicht in Genomeinheiten gespalten und es entstehen keine reifen Kapside. Eine Mutante in einem siebten Gen, UL25, zeigte bei HSV-1 einen abweichenden Phänotyp: die DNA wurde zwar in Genomeinheiten prozessiert, aber nur mit geringer Effizienz verpackt. Um die Funktion von UL25 näher zu untersuchen, wurde im Berichtszeitraum eine Deletionsmutante und ein spezifisches Antiserum für das PrV UL25 hergestellt. PrV UL25 ist für die Replikation in der Zellkultur essentiell, da eine Deletionsmutante produktiv nur auf Zellen repliziert, die das Protein *in trans* zur Verfügung stellen. In nicht transgenen Zellen wird die konkatemere DNA zwar in Genomeinheiten gespalten und diese auch in die vorgeformten Kapside verpackt, allerdings nur mit geringer Effizienz. Die entstehenden DNA-haltigen Kapside, die häufig auch nahe der inneren Kernmembran zu finden sind, knospen aber nicht an der inneren Kernmembran. Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass UL25-spezifische Markierung nur an den C-Kapsiden, aber nicht auf den Vorläufer- oder an defekten Kapsidformen zu finden ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass UL25 entweder selbst das Signal für den Durchtritt der C-Kapside durch die Kernmembran darstellt oder aber die Voraussetzung für die Anheftung weiterer Protein bildet, die dann für die Umhüllung an der inneren Kernmembran notwendig sind.

Charakterisierung funktioneller Domänen des großen Tegumentproteins UL36

UL36, das bei allen Herpesviren der Säuger, Vögel und Amphibien konserviert ist, kodiert für das größte aller Herpesvirusproteine, das bei PrV aus mehr als 3.000 Aminosäuren besteht. Das UL36 Protein ist bei allen bisher untersuchten Herpesviren essentiell für die Virusreplikation und bildet die innerste, direkt am Kapsid lokalisierte Schicht des Teguments. Im N-Terminus von PrV UL36 wurde ein Bereich identifiziert, der für die Interaktion mit einem weiteren Tegumentprotein, dem pUL37, notwendig ist. Die Funktion weiterer Regionen des UL36 ist allerdings noch unklar und sollte durch Deletion definierter Bereiche untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Datenbankanalysen und Sequenzvergleiche mit homologen Sequenzen anderer Herpesviren durchgeführt, wobei mehrere Herpesvirus- bzw. Alphaherpesvirus-spezifische Domänen identifiziert werden konnten. Ferner konnte ein wenig konservierter und auch wenig strukturierter Bereich nahe des C-Terminus von PrV UL36 definiert werden, während die ca. 100 C-terminalen Aminosäuren wiederum einen hohen Grad an Konservierung aufwiesen.

Während C-terminal verkürzte UL36 Proteine, denen verschieden große Bereiche fehlen, drastische funktionelle Defekte aufwiesen, war eine Variante mit einer großen internen Deletion im nicht konservierten Bereich, bei der allerdings die C-terminale konservierte Domäne erhalten blieb, funktionell aktiv.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die C-terminalen Aminosäuren im UL36 eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation spielen, während der ausgedehnte nicht konservierte Bereich nur eine untergeordnete Rolle spielt. Durch Hefe-2-Hybrid-Analysen sollen nun mögliche Funktions- und Interaktionspartner für den C-terminalen Bereich identifiziert werden.

Untersuchungen zur Funktion der viralen Proteinkinasen US3 und UL13

Herpesviren kodieren für mehrere Proteinkinasen. Während die von UL13 und UL39 kodierten Kinasen bei allen Herpesviren konserviert sind, gibt es US3 Homologe nur bei den Alphaherpesviren. Das Vorhandensein von Homologen des US3-Proteins von HSV-1 in allen Vertretern der Alphaherpesviren und in einer Vielzahl eukaryontischer Organismen legt eine wichtige Funktion dieser viralen Proteinkinasen im Replikationszyklus nahe. Untersuchungen an PrV und anderen Alphaherpesviren, v.a. HSV-1, weisen für das US3 Funktionen beim Egress von viralen Nukleokapsiden aus dem Zellkern, bei der Ausbildung zytomorphologischer Veränderungen nach Infektion und bei der Antagonisierung der infektionsbedingten Apoptose zu. Allerdings ist weder UL13 noch US3 für die Replikation von PrV in der Zellkultur essentiell. Während UL13-negative Mutanten ähnlich wie Wildtyp replizieren, ist US3 für die effiziente Freisetzung primär umhüllter Virionen aus dem Kernspalt notwendig und die Virustiter sind in Abwesenheit von US3 ca. 10fach reduziert. Fehlen allerdings gleichzeitig beide Kinasen, hat dies einen deutlichen Einfluss auf die Virusvermehrung, wobei aber noch unklar ist, ob die Proteine als Strukturbestandteile von Virionen wichtig sind oder ob die Kinaseaktivität dabei die entscheidende Rolle spielt.

PrV US3 wird in infizierten Zellen in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert, eine abundante ca. 40 kDa große Form und ein etwas größeres, aber minores ca. 53 kDa Protein. Die beiden Proteine besitzen unterschiedliche Translationsstartpunkte, haben aber einen gemeinsamen C-Terminus. Zur funktionellen Charakterisierung dieser beiden Formen sowie der Rolle, die die Kinaseaktivität während des Replikationszyklus hat, wurden über ortsspezifische Mutagenese die entsprechenden Startkodons mutiert, so dass entweder nur die lange oder nur die kurze Form exprimiert wird, sowie eine Inaktivierung der Kinaseaktivität des US3 bzw. UL13 durch Mutagenese des katalytischen Zentrums durchgeführt. Erste *In-vitro*-Untersuchungen zeigten dabei, dass die lange Form eine nur untergeordnete Rolle bei der Virusreplikation spielt, während die fehlende Kinaseaktivität für den veränderten Phänotyp der Deletionsmutante verantwortlich ist. Zur Klärung der Funktionsweise des PrV-US3 wurde ein Analysenschema zur Identifizierung von dessen Substraten erarbeitet. Es handelt sich um eine Variante des SILAC-Verfahrens (*stable isotope labelling with amino acids in cell culture*). Zellen wurden mit Wildtyp-PrV, mit einer US3-negativen Mutante oder mit einer US3-Mutante mit inaktivierter Kinasedomäne infiziert. Die Proteinextrakte der infizierten Zellen wurden mit massenmarkierten Extrakten nicht infizierter Zellen standardisiert und die Phosphoproteine des Gemisches über eine Metallchelate-Chromatographie isoliert. Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Phosphoproteine gelang dann nach zweidimensionaler Elektrophorese durch quantitative Massenspektrometrie.

Nach Infektion erwiesen sich die relativen Proteinmengen der meisten identifizierten Proteine als erstaunlich stabil. In den angereicherten Phosphoproteinen wurden allerdings auch einige intensiv modulierte Proteine gefunden. Dazu gehörten Proteine des Zytoskelettes, der Stressreaktion und der Kernlamina. Unterschiedliche Modulation nach Infektion mit Wildtyp-PrV oder einer der US3-Mutanten wurden bei den Hitzeschockproteinen beobachtet. Ob die beobachteten Veränderungen bei den Hitzeschockproteinen mit der antiapoptotischen Wirkung des US3 im Zusammenhang stehen, wird untersucht.

Untersuchungen zur Funktion der UL41-homologen Proteine der Alphaherpesviren

Die Existenz eines UL41 (HSV-1)-homologen Gens in allen bisher untersuchten Alphaherpesviren weist auf eine wichtige Funktion des entsprechenden Genproduktes, des *virion host shutoff* (vhs) Proteins, im Replikationszyklus dieser Viren hin. Das vhs Protein ist Bestandteil des Virions und bildet zusammen mit dem eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF4H einen ribonukleolytischen Enzymkomplex, der den Abbau von RNA, präferentiell von mRNA, katalysiert. Auf diese Weise kommt es unmittelbar nach der Fusion von Virus und Zelle und noch vor der Expression viraler Gene zu einem Abfall der Neusynthese zellulärer Proteine. Die Funktion des vhs Proteins wurde in verschiedenen Alphaherpesviren (HSV-1, BHV-1, PrV) untersucht. Für BHV-1 und PrV wurden UL41-negative Mutanten konstruiert und charakterisiert, eine UL41-negative HSV-1 Mutante lag vor (D. Leib). Die Untersuchung der Proteinbiosynthese einiger Hundert Proteine nach Virusinfektion durch metabolische Markierung mit radioaktiven Aminosäuren und anschließende Analyse durch 2D-Elektrophorese und quantitative Chemiluminographie ergab, dass nach Infektion von HeLa (HVS-1, PrV) und MDBK (BHV-1, PrV) Zellen mit allen untersuchten Viren ein effizienter Shutoff induziert werden konnte, unabhängig vom vhs Protein. Allerdings

war dieser nach Infektion mit der UL41-negativen BHV-1 Mutante im Vergleich zum Wildtyp erheblich verzögert.

Durch Anwendung einer Kombination aus metabolischer Markierung mit stabilen (nicht radioaktiven) Isotopen und anschließender massenanalytischer Quantifizierung (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*, SILAC) konnten erstmals die relativen Mengen einer größeren Anzahl ausgewählter Proteine nach Infektion von HeLa Zellen mit PrV und HSV-1 gemessen werden. Da keine kommerzielle Software verfügbar ist, um größere Zahlen von ‚*peptide mass fingerprint*‘ Massenspektren quantitativ auszuwerten, entstand die Notwendigkeit zur Entwicklung des eigenen Rechenprogramms AMADEUS (*Advanced Mass Distance Evaluation Spreadsheet*). Es handelt sich um eine Serie von Visual Basic for Applications-Makros für ein EXCEL™ Datenblatt. Zunächst werden die notwendigen Listen zur Steuerung eines automatischen Laufes eines Ultraflex (Bruker) Massenspektrometers erstellt. Nach Aufnahme der Spektren und der Datenbankabfrage werden für jedes Spektrum die für eine Quantifizierung verwertbaren Massensignale anhand der Identität des Proteins, der Aminosäuresequenz des zugeordneten Peptides und des verwendeten Isotops ermittelt. Die mittleren Intensitätsverhältnisse der qualifizierten Massen eines Spektrums werden ermittelt und statistisch ausgewertet. Schließlich erfolgt die Überführung der relevanten Daten in ein Format, das zur versuchsübergreifenden Auswertung in einer ACCESS™ Datenbank geeignet ist.

Trotz des oben geschilderten Shutoffs erwiesen sich die Mengen der meisten untersuchten Proteine als erstaunlich stabil und unterschritten sechs Stunden nach Infektion von HeLa Zellen mit PrV oder HSV-1 in der Regel nicht 70 % der Menge in nicht infizierten Zellen. Eine Ausnahme bildete das Hitzeschockprotein 27 (HSP27). Nach Infektion mit PrV oder HSV-1 fiel eine Isoform auf 30 bis 40 % des Ausgangswertes, eine andere zeigte keine Mengenänderung und eine dritte reagierte gegensätzlich, d.h. stieg nach Infektion an, unabhängig davon, ob mit dem Wildtyp oder der UL41-deletierten Mutante infiziert worden war. Somit kommt es nach Infektion mit PrV oder HSV-1 in HeLa Zellen zu einer dramatischen Verschiebung der Mengenverhältnisse verschiedener HSP27 Formen, deren Bedeutung für den Replikationszyklus untersucht wird.

Untersuchungen von Interaktionen viraler Proteine durch Hefe-2-Hybrid Studien

Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems konnten wir in der Vergangenheit verschiedene physikalische Interaktionen zwischen PrV-Proteinen aufzeigen, die für die primäre Umhüllung von Nukleokapsiden an der Kernmembran sowie für deren Tegumentierung und sekundäre Umhüllung im Zytoplasma relevant sind (siehe Jahresbericht 2002, Seite 21-31). Im vergangenen Jahr wurden diese Studien durch Einbeziehung der vermutlich an der Spaltung und Verpackung des Virusgenoms beteiligten UL6, UL17, UL25, UL32 und UL33 Genprodukte auf frühe Schritte der Virusmorphogenese ausgeweitet. Unmittelbare Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen selbst konnten bislang nicht festgestellt werden, doch zeigten sowohl das UL6- als auch das UL32-Genprodukt reproduzierbare Interaktionen mit dem carboxy-terminalen Abschnitt eines als Regulator der viralen Transkription beschriebenen Proteins (EP0). Für das UL33-Genprodukt wurden dagegen Wechselwirkungen mit überlappenden Abschnitten des UL8-Proteins gefunden, das als Komponente des Helikase-Primase-Komplexes an der viralen DNA-Replikation beteiligt ist. Obwohl alle genannten Proteine im Kern PrV-infizierter Zellen lokalisiert sind und aufgrund ihrer Funktionen direkt oder indirekt an das Virusgenom binden müssen, bleibt die biologische Relevanz dieser Interaktionen zu prüfen, zumal EP0 im Gegensatz zu den anderen Genprodukten nicht essentiell für die produktive Virusreplikation ist.

Ein zweiter neuer Aspekt ist die Untersuchung möglicher Interaktionen viraler Genprodukte mit zellulären Proteinen, die für den intrazytoplasmatischen Transport von eindringenden oder reifenden Virionen notwendig sein könnten. Offensichtlich bewegen sich die mit wenigen Tegumentproteinen, darunter den UL36 und UL37 Genprodukten, assoziierten Nukleokapside mit Hilfe zellulärer Motorproteine entlang von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Deshalb werden die beiden genannten PrV-Proteine zurzeit im Hefe-2-Hybrid-System auf Interaktionen mit Proteinen einer cDNA-Expressionsbibliothek aus Mäusezellen untersucht. Da für HSV-1 in ähnlichen Studien eine Interaktion des UL35-Kapsidproteins mit Komponenten des Motorproteinkomplexes Dynein gefunden worden war, wurde auch das homologe Genprodukt von PrV in die Experimente einbezogen. Bislang konnten jedoch keine entsprechenden Interaktionen des UL35 Proteins von PrV festgestellt werden, und auch die moderaten Replikationsdefekte einer UL35-negativen PrV-Mutante (s.o.) sprechen gegen eine zentrale Rolle des Proteins bei Viruseintritt oder -freisetzung. Die UL36 und UL37 Proteine von PrV zeigten dagegen reproduzierbare Wechselwirkungen mit überlappenden Expressionsprodukten einiger zellulärer Gene,

deren genaue Funktionen allerdings noch unklar sind. Deshalb bleibt zu prüfen, ob und bei welchen Schritten des viralen Replikationszyklus die festgestellten Interaktionen relevant sind.

1.14.3 Untersuchung der Bedeutung viraler Proteine für die Neuroinvasion durch Herpesviren

Klopfleisch, R., Teifke, J.P., Klupp, B.G., Fuchs, W. und Mettenleiter, T.C.*

Die Gene UL11, UL16 und UL21 sind bei Herpesviren der Säuger und Vögel hochkonserviert. PrV-Mutanten, denen eines, zwei oder alle drei Proteine fehlen, sind in der Lage, sich in der Zellkultur zu vermehren, zeigen jedoch ultrastrukturell Einschränkungen der sekundären Umhüllung im Zytoplasma. Bei PrV konnten wir letztes Jahr einen Komplex aus den UL16 und UL21 Genprodukten identifizieren, während bei HSV-1 eine Interaktion der UL11 und UL16 Genprodukte gezeigt wurde. Somit könnte ein tripartiter Komplex als funktionelle Einheit vorliegen. Zur Untersuchung der Bedeutung dieser Proteine und ihrer Interaktion für die Neuroinvasion wurden CD1-Mäuse mit den Deletionsmutanten PrV- Δ UL11, PrV- Δ UL16, PrV- Δ UL16/UL11, PrV- Δ UL16/UL21 und PrV- Δ UL16/UL11/UL21 intranasal inokuliert und die mittleren Überlebenszeiten ermittelt. Zur Untersuchung der Kinetik der Virusausbreitung im peripheren und zentralen Nervensystem der Mäuse wurden Serienschnitte des entkalkten Schädels der Mäuse angefertigt und mittels Immunhistologie gegen das UL19-Hauptkapsidprotein des PrV gefärbt. Während nach Infektion mit PrV- Δ UL21, PrV- Δ UL16, PrV- Δ UL11 und PrV- Δ UL16/UL11 Überlebenszeiten von 71, 81, 83 bzw. 66 h auftraten (Wildtyp: 49 h), spielt der UL16/UL21-Komplex offenbar eine wichtigere Rolle bei der Neuroinvasion. So zeigte die UL16/UL21 Doppelmutante eine ausgeprägte Attenuierung der Neurovirulenz bei unveränderter Neuroinvasion und im Vergleich zu Wildtyp-PrV deutlich verlängerte Überlebenszeiten von 131 h. Trotz einer ausgeprägten Entzündungsreaktion im Trigeminalganglion und in vegetativen Ganglien sowie dem Hirnstamm waren zu allen Zeitpunkten immunhistologisch in diesen Lokalisationen nur wenige infizierte Zellen nachweisbar. Außergewöhnlich war die nach 131 Stunden zu beobachtende Infektion einer Vielzahl von kortikalen Neuronen. Die zusätzliche Deletion von UL11 in PrV- Δ UL16/UL21/UL11 führte zu keiner weiteren Veränderung des *In-vivo*-Phänotyps. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der UL16/UL21 Komplex *in vivo* zwar an der Replikation und Morphogenese in Neuronen, nicht jedoch an der Neuroinvasion in der Maus beteiligt ist. Um die Apoptose infizierter Zellen zu blockieren und somit die Produktion viraler Nachkommen zu maximieren oder eine latente Infektion zu ermöglichen, haben Herpesviren eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen entwickelt. So konnten einige antiapoptotische Proteine für HSV-1 und BHV-1 nachgewiesen werden. Zum Nachweis der apoptose-modulierenden Eigenschaften verschiedener PrV-Proteine wurden Gewebeschnitte von Mausgehirnen nach Infektion mit einer Reihe von Deletionsmutanten immunhistologisch auf die Anwesenheit aktivierter Caspase 3 hin untersucht (PrV Δ -UL3, -UL4, -UL7, -UL11, -UL13, -UL16, -UL17, -UL21, -UL31, -UL34, -UL37, -UL41, -UL43, -UL46, -UL47, -UL48, -UL51, -US3, -US9, -gE, -gM, -UL11/US9, -UL16/UL11, -UL16/UL21, -UL16/UL11/UL21, -UL11/gE, -UL11/gM, -UL43/gK, -UL43/gM, -UL43/gK/gM). Sowohl bei PrV-Wildtyp als auch bei allen untersuchten Mutanten konnte ein apoptotischer Untergang von Gliazellen und infiltrierenden Leukozyten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten degenerierende Neuronen mit diesem Antikörper kein positives Signal. Dies lässt darauf schließen, dass keines der deletierten Proteine Einfluss auf die Apoptose von Neuronen hat.

1.14.4 Pseudorabies Virus (PrV)

Bekämpfung der Aujeszky'schen Krankheit in Deutschland

Müller, T.*, Teuffert, J., Ziller, M., Selhorst, T. und Conraths, F.J.

Die Bundesrepublik Deutschland war auch 2005 offiziell als frei von Aujeszky'scher Krankheit (AK) anerkannt. Der durch das NRL für Aujeszky'sche Krankheit erarbeitete stufenweise Stichprobenplan hinsichtlich der Überwachungsuntersuchungen zur Aufrechterhaltung eines von der AK freien Status wurde in der Neufassung der AK-VO berücksichtigt.

Es gibt epidemiologische Anhaltspunkte, dass sich Infektionen mit dem Virus der AK in Schwarzwildbeständen in Deutschland ausbreiten. Im Dezember 2005 wurde erstmals die Isolierung eines PrV vom Schwarzwild aus Sachsen durch das NRL bestätigt. Die Viruscharakterisierung mittels RFLP ergab das

Vorliegen eines PrV Typ 1 sw (5-10/5-12 Doppelfusionsbande). Es handelt sich demzufolge um den gleichen Virustyp der auch in den Ländern Brandenburg und Sachsen-Anhalt isoliert wurde.

Studien zur maternalen Immunität bei Wildschweinen zeigten, dass maternale Antikörper bei Frischlingen bis zu 27 Wochen im ELISA nachgewiesen werden können, während neutralisierende Antikörper nur bis zu 15 Wochen post partum vorhanden sind.

Die Charakterisierung europäischer PrV-Isolate vom Schwarzwild mittels Sequenzierung des für das Glykoprotein C kodierenden Genomabschnittes wurde abgeschlossen. Die phylogenetischen Analysen lassen eine eindeutige epidemiologische und geographische Unterscheidung der PrV-Isolate zu.

Weitere Projekte

Kinetik PrV-spezifischer maternaler Antikörper beim Schwarzwild

Müller T., Teuffert, J. und Conraths, F.J.

Vergleichende molekularbiologische Charakterisierung von PrV Isolaten vom Schwarzwild

Müller, T., Klupp, B.G., Conraths, F.J. und Hahn, E.C.

Sensitivitätsvergleich verschiedener PrV-spezifischer PCRs für die Routinediagnostik

Müller T., Rhiza H.-J. und Conraths F.J.

Real-Time PCR für die Detektion von Pseudorabies Virus

Müller, T., Rziha, H.-J., Geue, L. und Conraths, F.J.

Analytische Sensitivität von PrV-Antikörper ELISAs

Müller, T.

1.14.5 Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV-1)

Das Bovine Herpesvirus vom Typ 1 (BHV-1) gehört zum Genus *Alphaherpesvirus* der Familie *Herpesviridae*. BHV-1 ist der Erreger der infektiösen bovinen Rhinotracheitis und infektiösen pustulösen Vulvovaginitis (IBR/IPV-Virus). Infektionen mit BHV-1 führen nach der akuten Phase mit Virusausscheidung und Virämie unabhängig von den klinischen Symptomen und dem immunologischen Status der betroffenen Rinder zur lebenslangen latenten BHV-1-Infektion. Wichtiger Bestandteil der BHV-1-Bekämpfung ist die Möglichkeit der Vakzinierung mit gE-Deletionsvakzinen (Markervakzine) und die gezielte Differenzierung von geimpften und „Feldvirus“-infizierten Rindern durch den Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern (Markerdiagnostik). Dieses Prinzip wird auch als DIVA-Strategie (*differentiating infected from vaccinated animals*) bezeichnet. Die laufenden Arbeiten zu BHV-1 haben auf der einen Seite das Ziel, Virusaufbau, -replikation und -pathogenese besser zu verstehen, auf der anderen Seite sollen die Bekämpfung betreffende Maßnahmen wie die Vakzinierung, Markerdiagnostik und BHV-1-Epidemiologie untersucht werden.

Weiterentwicklung der BHV-1-Markerdiagnostik

Beer, M.*, Hoffmann, B., Kühn, K. und König, P.

(in Zusammenarbeit mit der Dr. Bommeli AG/IDEXX)

Ein auf rekombinantem Glykoprotein E (gE) sowie gE/gI des BHV-1 basierender *blocking*-ELISA wurde mit Referenzseren und mehr als 200 definierten positiven und negativen Feldseren vollständig validiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das neue Testsystem mit Sensitivitätswerten > 85 % und Spezifitätswerten von > 99 % mindestens so leistungsfähig ist wie der einzige derzeit zur Verfügung stehende kommerziell erhältliche ELISA-Test. Ein erster Einsatz des rekombinanten gE als Antigen in einem indirekten Test zum Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern in Milchproben zeigte zudem, dass grundsätzlich positive und negative Proben differenziert werden konnten. Da derzeit kein verlässliches Testsystem für den Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern aus Milchproben zur Verfügung steht, sind weitere Entwicklungen auf diesem Sektor geplant.

Untersuchung der molekularen Pathogenese der BHV-1-Infektion mittels BHV-1 BAC

Beer, M.*, Kalthoff, D. und König, P.

Verschiedenste Mutanten wurden auf der Basis eines BHV-1-BAC-Konstruktes (bakterielles artifizielles Chromosom, Stamm Schönböken) hergestellt und *in vitro* charakterisiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Deletionsmutanten des UL49 (vp22) gelegt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass BHV-1-Mutanten mit einer Deletion von gE und UL49 (Doppeldeletionsmutante BHV-1- Δ gE Δ UL49) erheblich in ihrer Fähigkeit zur Ausbreitung von Zelle zu Zelle (*cell-to-cell-spread*) beschränkt sind. Die Plaquegrößen dieser Mutanten sind um etwa 90 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die Virustiter der Mutanten unterscheiden sich hingegen kaum von denjenigen des Wildtyps oder der Einzelmantanten. Mit Hilfe von Revertanten gelang es zu belegen, dass eine alleinige Deletion von UL49 den *cell-to-cell-spread* bereits erheblich beeinflusst. Die Plaquegrößen waren hier um etwa 40 % reduziert. Dem UL49-Genprodukt von BHV-1 konnte somit erstmalig eine entscheidende Rolle für die effiziente Ausbreitung von Zelle zu Zelle zugeschrieben werden. Neben gE ist UL49 somit der zweite wichtige Faktor für den *cell-to-cell-spread* des BHV-1.

Erarbeitung von neuen Strategien zur Immunprophylaxe der BHV-1-Infektion

Beer, M.*, Kalthoff, D. und König, P.

(in Zusammenarbeit mit der Riemser Arzneimittel AG, Greifswald-Insel Riems)

Auf Basis des hochvirulenten BHV-1-Wildtypstammes 2204 wurden gE-Deletionsmutanten durch Insertion einer BAC-Sequenz hergestellt. Nach vollständiger Deletion der inserierten Sequenzen wurde der neue Virusstamm 2204 Δ gE Plaque-gereinigt und *in vitro* charakterisiert. BHV-1 2204 Δ gE soll die Basis für neue gE-deletierte BHV-1-Vakzinen bilden. In einem ersten Versuch wurden hochtitrige Präparationen inaktiviert, mit Adjuvanz versehen und zur Immunisierung von Tieren verwendet. In zukünftigen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien sollen Doppeldeletionsmutanten auf Basis des Vakzinestammes BHV-1 2204 Δ gE charakterisiert und auf ihre Eignung als Vakzinekandidat geprüft werden.

Molekularbiologie des bovinen Herpesvirus Typ 1: BHV-1 Glykoprotein B als Transporter für sekretierte biologisch aktive Proteine

Keil, G.* und Sadowski, A.

Die Spaltung von membrangebundenen und sekretierten Proteinen durch Furin im Trans-Golgi Netzwerk (TGN) ist ein Mechanismus der häufig zur Aktivierung viraler Proteine und biologisch aktiver Peptide notwendig ist. Für die Endoproteolyse ist ein Aminosäuremotiv mit der Konsensussequenz RXK/RR notwendig. Eine Besonderheit weist das F₀-Vorläuferprotein des Fusionsproteins F des bovinen respiratorischen Syncytialvirus auf, das zwei Furinsspaltstellen im Abstand von 27 Aminosäuren besitzt. Dieses so genannte pep27 wird nach Spaltung des F₀ ausgeschnitten und sezerniert. Wir konnten zeigen, dass dies im Prinzip auf das Glykoprotein B von BHV-1, das nur einmal durch Furin gespalten wird, übertragbar ist. Unter anderem wurden bovines Interleukin 2 und bovines alpha-Interferon in gB eingebettet und nach Spaltung im TGN sezerniert. Um zu prüfen, ob dieser Ansatz auch für die Sekretion biologisch aktiver Peptide mit nur ca. 30 Aminosäuren Länge einsetzbar ist, wurden die Codons für die Defensine Lactoferricin, Cecropin und Dermaseptin in das gB Leseraster integriert und die jeweiligen mutierten Gene in das BHV-1-Genom integriert. Die resultierenden Rekombinanten exprimierten die modifizierten gB-Varianten, die wie vorgesehen in infizierten Zellen prozessiert wurden. Der Nachweis der Sekretion der Defensine und die Bestimmung deren biologischer Aktivität steht noch aus.

Stand der Bekämpfung der Bovinen Herpesvirus-Typ 1-Infektion (BHV-1) in Deutschland

Teuffert, J.*

Mittels Berichtsbogen übermittelte Angaben aus den Bundesländern bildeten die Grundlage für die Auswertung des Standes der BHV-1-Bekämpfung auf Bundes- und Landesebene.

Per 31.12.2004 zeigt die bundesweite Auswertung, dass unter Einbeziehung von 172.469 Beständen aus dem Milch- und Mutterkuhbereich folgender Stand in der BHV-1-Sanierung erreicht ist:

70,8 % der Bestände sind BHV-1-frei
20,2 % der Bestände befinden sich im Sanierungsverfahren
9,0 % der Bestände sind der Kategorie "sonstige Bestände" zuzuordnen.

Für den gleichen Zeitraum ergibt sich unter Einbeziehung von 11.902.015 Rindern, dass

60,2 % der Rinder BHV-1-freien Beständen
32,5 % der Rinder Sanierungsbeständen und
7,3 % der Rinder "sonstigen Beständen" zuzuordnen sind.

Betrachtet man den Auswertungszeitraum 1. Halbjahr 2001 bis zum 31.12.2004, so hat sich bundesweit der BHV-1-freie Anteil bestandsbezogen um 19,2 % und tierbezogen um 10,4 % erhöht. Das heißt, der Zuwachs kommt hauptsächlich aus kleinen und mittleren Betrieben. In der Kategorie "sonstige Bestände" nahmen der bestandsbezogene Anteil um 25,1 % und der tierbezogene Anteil um 14,3 % ab. Das ist einerseits ein deutliches Anzeichen dafür, dass sich immer mehr Betriebe dem BHV-1-Bekämpfungsprogramm anschließen, es andererseits aber noch 9 % der Betriebe gibt, die keine zielgerichtete BHV-1-Bekämpfung betreiben.

In Beständen der spezialisierten Jungrinderaufzucht und Mastrinderhaltung, die neben der Milchvieh- und Mutterkuhhaltung ausgewertet wurden, ergibt sich bundesweit, dass

61,8 % der 6.341 einbezogenen spezialisierten Jungrinderaufzuchtbestände und
14,5 % der 35.437 analysierten Rindermastbestände BHV-1 frei sind.

Länderebene:

Die Bundesländer Bayern und Sachsen-Anhalt sind in der BHV-1-Bekämpfung am weitesten fortgeschritten. Per 31.12.2004 standen dort 93,5/90 % bzw. 87/97,9 % der Bestände/Rinder in der Kategorie "BHV-1-frei".

Den größten Anteil im Sanierungsbereich stellen die ostdeutschen Bundesländer. So befanden sich am Jahresende 2004 in Thüringen 66,5 %, in Brandenburg 60 %, in Sachsen 57,9 % und in Mecklenburg-Vorpommern 55,6 % der Rinder in der BHV-1-Sanierung, die in diesen Bundesländern vorwiegend mit Hilfe der Gesamtbestandsimpfung durchgeführt wird. Als Schwerpunkte der BHV-1-Bekämpfung weist die statistische Auswertung insbesondere auf die Bundesländer Rheinland-Pfalz, Nordrhein-Westfalen und Schleswig-Holstein. In diesen Ländern finden sich 25,6/23,6 %; 17,6/22,7 % bzw. 6,6/19,6 % der Bestände/Rinder in der Kategorie "sonstige nicht BHV-1-freie Bestände". In dieser Kategorie finden lt. Definition keine zielgerichteten BHV-1-Bekämpfungsmaßnahmen statt.

Erfolgreiche BHV-1-Sanierung in einem Rindergroßbetrieb

Teuffert, J.*, Schielke, G. und Grübel, F.

Im Rahmen eines Forschungsauftrages wurden etwa 5.000 Rinder eines Rindergroßbetriebes in die BHV1-Sanierung mittels BHV1-Markeringpfstoffesinsatz einbezogen. Die Hauptzielstellung bestand in der Erlangung des BHV1-freien Status für den Prüfbetrieb. Einzelne Aufgaben betrafen die Prüfung der Markeringpfstoffe unter praxisnahen Bedingungen im Großbestand mit hoher Herdenrotation bei gleichzeitigem Vorliegen anderer Bestandsinfektionen (z.B. BVD), die Bewertung der Markervakzinen hinsichtlich Wirksamkeit zur Verhütung ökonomischer Ausfälle sowie Aussagen zur Dauer, zum Aufwand und zur Sicherheit solcher Sanierungsmodelle.

Mittels kontinuierlicher Gesamtbestandsimpfung aller Rinder älter als drei Lebensmonate mit BAYOVAC® IBR-Markervivum im Sanierungszeitraum, die nur vorübergehend von April 1999 bis November 2000 durch den inaktivierten Markeringpfstoff ersetzt wurde, und begleitender serologischer Überwachung im Herdcheck® Anti-IBRgE der IDEXX GmbH gelang es, den BHV1-freien Status für den Jungtier- und Milchviehbereich des Prüfbetriebes zu erreichen.

BHV-1-Sanierung im Überblick (Stand: Nov. 2004)

Betriebs-einheit	Datum Sanierungs-beginn	Datum der BHV 1-freien Anerkennung	Anzahl serologi-scher Unter-suchungen bis zur Anerkennung	Datum der Einstellung der Impfung	Anzahl Einzel-impf. insges.	BVD/MD unver-dächtig seit*
MVA F1	April 1995	20.12.01	4.146	12/2001	20.701	18.04.02
MVA F2	April 1995	31.12.03	1.687	12/2003	8.396	25.03.01
JRA	April 1995	31.12.01	3.663	Herbst 2004	21.699	18.04.02
Kälber-aufzucht	April 1995		keine	Herbst 2004	12.622	
Mutterkuh-bereich	April 1995	noch in Sanie-rung	1.740 bis 2002	Mutterkühe u. weibl. Nachzucht werden noch geimpft	17.679	

* Sanierungsbeginn 1996

Erstmals nach Sanierungsbeginn entnommene Stichproben im Jungrinderbereich des Jahres 1996 sowie die Untersuchungsergebnisse der seit Oktober 1996 lückenlos kontrollierten tragenden Färsen zum Zeitpunkt der Umstellung in den Milchviehbereich wiesen darauf hin, dass das BHV1-Infektionsgeschehen in der Jungrinderhaltung unmittelbar nach Impfbeginn erloschen ist. Damit war die Voraussetzung für die Reproduktion der Milchkuhbestände mit BHV1-freien Färsen gegeben.

Über den gesamten Sanierungszeitraum wurden in beiden Milchviehanlagen (MVA) insgesamt 28 Markerimpfungen aus eigener Nachzucht mit einem bzw. mehreren BHV1-gE-fraglichen oder -positiven Antikörperreaktionen ermittelt. Bei fünf dieser 28 Tiere deuten BHV1-positive Ergebnisse auf eine stattgefundene Feldvirusinfektion. Das Gleiche gilt für vier Wechselreagenten. Die restlichen 19 Tiere wurden negativ für BHV1 abgeklärt bzw. als fraglich befundene Tiere der Schlachtung zugeführt. Darüber hinaus stellten in der MVA F2 Zukaufstiere insofern ein Problem in der BHV1-Sanierung dar, als von 251 eingestellten Rindern zwölf im gE-ELISA positiv und eine fraglich für BHV1 reagierten. Dennoch vermochten alle für BHV1 auffälligen Tiere den Sanierungsverlauf der beiden MVA unter Einbeziehung der Gesamtbestandsimpfung nicht nachhaltig zu stören. Das spricht eindeutig für den Impfstoff und dessen Handhabung im Prozess der Sanierung.

Weitere Ergebnisse dieser Studie sind im Abschlussbericht des FLI zu dem Projekt (Januar 2005) zusammengestellt.

1.14.6 Herpesvirus-bedingte Fischkrankheiten: Koi Herpesvirus (KHV) und Aal-Herpesvirus (HVA)

Diagnostische Untersuchungen zum Nachweis des Koi Herpesvirus (KHV)

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

Seit 2003 verursacht das Koi-Herpesvirus (KHV), auch bezeichnet als *Cyprinid Herpesvirus-3* (*CyHV-3*) enorme ökonomische Verluste bei Nutzkarpfen und Kois (*Cyprinus carpio*). Vor allem die Freistaaten Sachsen und Bayern, aber auch Thüringen und Sachsen-Anhalt waren von KHV-Ausbrüchen betroffen. Es ist i.d.R. kein Problem, das Virusgenom aus erkrankten Fischen mittels PCR nachzuweisen. Schwieriger ist eine Isolierung des Erregers in den empfänglichen Zellkulturen KF-1 (koi fin cells) und CCB (common carp brain cells). Dies gelingt sehr selten, da sich das Virus nach zwei bis fünf Passagen nicht mehr repliziert. Noch schwieriger ist es, KHV bei latent/persistent infizierten Tieren mittels o.g. Methoden zu detektieren. Wir leiteten daher weitere acht KHV-spezifische Primer aus bekannten Sequenzen ab und prüften diese im Vergleich zu den veröffentlichten PCR- und *real-time* PCR-Verfahren auf ihre diagnostische Sensitivität und Spezifität. Es wurden dabei sowohl verschiedene DNA-

Extraktionsverfahren als auch unterschiedliche DNA-Polymerasen für die PCR geprüft. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und mit Genbank-Daten verglichen.

Nachweis des KHV in Zierfisch- und Wildfischspezies

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

(in Zusammenarbeit mit Steinhagen, D., und Meyers, K. [Tierärztliche Hochschule Hannover]; Biffar, M. [Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe Deutschland e.V.] und Kempfer, J. [Universität Szczecin])

In den Jahren 2004/2005 traten epidemiologisch ungeklärte, akute Ausbrüche von KHV-Infektionen ohne ursächliche Zusammenhänge zu infizierten Koi- oder Nutzkarpfen-Beständen auf. Bei Untersuchungen von verschiedenen Zierfischspezies (Cypriniden, Perciden, Ictaluriden), die meist zusammen mit Kois gehalten wurden bzw. deren Haltungssysteme über ein Filtersystem verbunden waren, konnten mit Hilfe der PCR, RT-PCR und nachfolgend der nested PCR KHV-Genom nachgewiesen werden. Die Bestätigung der Ergebnisse erfolgte durch Sequenzierung der Amplifikate oder durch die *In-situ*-Hybridisierung (ISH). Die Isolierung des Virus in CCB-Zellen gelang nur für 3-4 Passagen vom Goldfisch (*Carassius auratus*). In der fünften Passage waren weder ein CPE zu erkennen, noch das Virus nachzuweisen. Die Untersuchungen dauern an. Weiterhin gelang der Nachweis des KHV bei Wildfischen (Karpfen, Karauschen [*Carassius carassius*]) mittels PCR, nested PCR und ISH.

Untersuchungen zur Attenuierung von Aal-Herpesviren (HVA)

Schrudde, D., Fichtner, D., Riechardt, M. und Bergmann, S.M.*

(in Zusammenarbeit mit Bentlage, H. [ALBE-Fischfarm, Niedersachsen])

Das Aalherpesvirus (*Herpesvirus anguillae* HVA, *Anguillid herpesvirus-1*, *AngHV-1*) wurde in den letzten Jahren vermehrt aus in Aquakultur gehaltenen Europäischen Aalen (*Anguilla anguilla*) und Wildfängen bzw. Kadavern isoliert. In der Aquakultur, die auf Wildfängen von Glas-Aalen basiert, ist es mittlerweile zum ernsthaften Problem geworden. Hintergrund ist die nahezu 100%ige Mortalität, die das Virus bei den Jungaalen verursachen kann, und der zunehmende Wert der Glas-Aale. Neben aus Glas-Aalen isolierten Reo-, Picorna- und verschiedenen Rhabdoviren stellt das HVA offensichtlich die größte Gefahr für die Aal-Aquakultur dar. Im Rahmen eines Drittmittel-Projekts wird an einer Lebendvakzine zum Schutz der Aale gegen die Infektion mit dem HVA gearbeitet, nachdem Untersuchungen mit einer inaktivierten HVA-Antigenpräparation die Verluste von 60-90 % auf 8-10 % reduzieren konnten. Erste Untersuchungen zur Attenuierung der Viren in verschiedenen Zellkulturen (u.a. EK-1, RTG-2, EPC, CHSE-214, SAF-1, TV-1, SSN-1) bei verschiedenen Temperaturen (15, 20, 26 °C) und der Vermehrung im heterologen Tier (Karpfen) zeigen, dass das Wirtsspektrum des Virus größer ist als bisher angenommen. Geplant sind weitere Untersuchungen zur Latenz/Persistenz, zur Virogenese und zur Pathogenese der HVA-Infektion.

1.15 IRIDOVIREN

Vergleich von systemischen und nicht systemischen Iridoviren

Stumpf, P., Schütze, H. und Bergmann, S.M.*

Es wurden Vermehrungsexperimente von zwölf Iridovirusisolaten (systemisch) aus dem Süßwasserbereich und vier Isolaten aus dem marinen Bereich (systemisch und nicht systemisch) in EPC-, BF-2 und FHM-Zellkulturen bei 15 und 20° C durchgeführt. Alle Isolate aus dem Süßwasser und ein Isolat vom tropischen Buntbarsch werden dem Genus *Ranavirus* und die drei Viren aus dem Salzwasser dem Genus *Lymphocystivirus* (LCDV) zugeordnet. Teile des „major capsid protein gene (MCP)“ wurden mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Für den Nachweis der Ranaviren wurde eine von der OIE empfohlene PCR verwendet. Die LCDV wurden mit einer selbst etablierten PCR detektiert. Mit den eingesetzten Primerpaaren für Ranaviren konnten keine Bereiche des MCP der LCDV nachgewiesen werden. In den Reaktionen der Ranaviren mit den LCDV-Primern waren die Ergebnisse gleichfalls negativ. Die Sequenzen der PCR-Produkte der LCDV unterschieden sich von denen der Ranaviren. Untereinander waren die LCDV-

Sequenzen vom MCP der Kliesche (*Limanda limanda*), der Scholle (*Pleuronectes platessa*) und der Doggerscharbe (*Hippoglossoides platessoides*) sehr ähnlich und gleichen denen der Flunder (*Platichthys flesus*) aus der Gen-Datenbank. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um das gleiche Virus handelt, das unterschiedliche Spezies infizieren kann.

1.16 BUNYAVIREN

1.16.1 Hantaviren

Ulrich, R.*, Schmidt, J., Friedrich, R., Mertens, M., Dettmer, C., Minke, L., Ullrich, K. und Conraths, F.J.

(in Zusammenarbeit mit Essbauer, S.S., Pfeffer, M., Wölfel, R., Dobler, G. [Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München], Wenk, M. [Landesforstanstalt Eberswalde], Pelz, H.-J., Jacob, J. [Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde, Münster], Wegener, W., Madeja, E.L. [Gesundheitsamt Köln, Köln], Quast, H. [Schledehausen], Bradt, K. [Infektionsepidemiologie, Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, Hannover], Mühle, R.-U. [Universität Potsdam], Koch, J., Ehlers, B. [Robert Koch-Institut, Berlin], Petraityte, R., Zvirbliene, A., Gedvilaitė, A., Sasnauskas, K. [Institute of Biotechnology, Vilnius], Jäkel, T. [GTZ, Bangkok], Yoshimatsu, K., Arikawa, J. [Institute for Animal Experimentation, Hokkaido University, Sapporo])

Hantaviren sind Zoonoseerreger, die durch persistent infizierte Nagetiere auf den Menschen übertragen werden. In Abhängigkeit von der krankheitsauslösenden Hantavirus-Spezies sind beim Menschen zwei Krankheitsbilder beschrieben worden, das „Hämorrhagische Fieber mit renalem Syndrom“ (HFRS) und das „Hantavirale cardiopulmonale Syndrom“ (HCPS). Auf Grund der geographischen Verbreitung der Nagetierreservoirs der verursachenden Hantavirus-Spezies tritt das HCPS ausschließlich in Amerika auf, während das HFRS vor allem in Europa und Asien beobachtet wird.

Bisherige serologische und molekularbiologische Untersuchungen in Deutschland zeigten das Vorkommen von mindestens drei verschiedenen Hantavirus-Spezies: das von der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) übertragene *Puumalavirus* (PUUV), das von der Feld- und Erdmaus (*Microtus arvalis*, *M. agrestis*) übertragene *Tulavirus* (TULV) und das *Dobrava-Belgrade-Virus* (DOBV), das von der Brandmaus *Apodemus agrarius* (DOBV-Aa) und der Gelbhalsmaus *A. flavicollis* (DOBV-Af) übertragen wird. Während PUUV- und DOBV-Infektionen beim Menschen zu unterschiedlich schweren Verläufen des HFRS führen, ist bisher nur wenig über die Humanpathogenität des TULV bekannt.

Im Rahmen der Bemühungen zum Aufbau eines deutschlandweiten Netzwerkes zum langfristigen Monitoring von Nagetieren, Nagetier-übertragenen Pathogenen und deren potentiellen Veränderungen konzentrierten sich Untersuchungen in einer Pilotstudie im Land Brandenburg auf die Verbreitung von Hantavirus-Infektionen bei Nagetieren. In den Jahren 2002 bis 2004 wurden im Land Brandenburg an zehn Fangorten, die fünf verschiedene Habitate repräsentieren, Nagetiere gefangen. Bei 31 Transudaten von insgesamt ca. 1000 Nagetieren wurden Hantavirus-spezifische Antikörper nachgewiesen. Erste molekularbiologische Untersuchungen bestätigten das Vorkommen von TULV.

Im Rahmen von Untersuchungen zum gehäuften Auftreten von klinisch apparenten Hantavirus-Infektionen in Niederbayern (2004), in der Stadt Köln (2005) und in Stadt und Landkreis Osnabrück (2005) wurden dort 62, 53 bzw. 35 Nagetiere gefangen und auf das Vorliegen von Hantavirus-spezifischen Antikörpern und viralem Genom getestet. Bei in den drei genannten Regionen gefangenen Rötelmäusen konnten serologisch und/oder molekularbiologisch PUUV-Infektionen nachgewiesen werden. Phylogenetische Analysen der PUUV-Sequenzen zeigten deutliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Fangorten, die auf das Vorkommen von drei verschiedenen PUUV-Stämmen hinweisen.

Erste molekularbiologische Untersuchungen zum Vorkommen von Herpesviren in wild lebenden Nagetieren aus Deutschland und Thailand zeigten eine Vielfalt von verschiedenen beta- und gamma-Herpesviren, die gegenwärtig genauer molekularbiologisch charakterisiert werden.

Zukünftig sollen die Untersuchungen im Rahmen des Netzwerkes auf weitere Bundesländer ausgedehnt werden. Die Untersuchungen von Nagetieren in Niederbayern, Köln und Osnabrück sollen fortgeführt werden. Weitere Kooperationen sollen etabliert werden, um die Nagetiermaterialien für Untersuchungen zur Verbreitung weiterer Nagetier-übertragener Pathogene in Deutschland zu nutzen.

1.17 IMMUNOLOGIE

1.17.1 Immunsystem des Schweines

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. 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 MHC Klasse II Molekülen beschäftigen, ist das Ziel dieses Projektes die Konstruktion eines porcinen MHC Klasse II SLA-DQ Tetramers für 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 isolierten 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 Baculovirusexpressionsvektor inseriert und rekombinante Baculoviren hergestellt. Beide Untereinheiten konnten exprimiert und unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden. Nach der spezifischen Biotinylierung soll die Tetramerbildung mit Hilfe von Streptavidin erfolgen.

1.17.2 Immunsystem des Geflügels

Immunantwort von Hühnerküken auf unterschiedliche *Salmonella*-Serovaren

Berndt, A.*, Pieper, J. und Methner, U.

Zur Untersuchung der Fähigkeit verschiedener *Salmonella*-Serovaren, eine frühe Immunantwort auszulösen, wurden Eintagsküken mit *S. Enteritidis* (SE), *S. Typhimurium* (STM), *S. Hadar* (SH) und *S. Infantis* (SINF) oral infiziert. Zwischen vier Stunden und neun Tagen nach Infektion wurde die Anzahl relevanter Immunzellen (Granulozyten, Makrophagen, CD8⁺ und gamma/delta T-Zellen) im Blut, Zäkum und der Zäkaltonsille sowie die Lokalisation von Salmonellen in der Zäkumwand mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie ermittelt.

Zwischen vier Stunden und neun Tagen nach Infektion konnten Salmonellen im Epithel und der Lamina propria des Zäkums gefunden werden. SE zeigte die stärkste, STM und SH mittlere und SINF kaum eine Invasion in die zäkale Darmwand. Darüber hinaus konnte zwischen Tag 1 und Tag 9 nach Infektion mit SE, STM und mit geringerer Deutlichkeit auch mit SH ein signifikanter Anstieg der Anzahl von Granulozyten und Makrophagen im Zäkum beobachtet werden. Außerdem fanden sich vom zweiten Tag an nach Infektion mit SE, STM und SH deutlich mehr CD8⁺ und gamma/delta T-Zellen im Zäkum und im Blut. Dagegen wurden in der Zäkaltonsille erst vier Tage nach SE Infektion signifikant mehr Immunzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren detektiert.

Generell war die immunologische Reaktion nach SE Infektion am stärksten ausgeprägt, STM und SH infizierte Tiere zeigten moderate Veränderungen. Nach SINF Infektion konnte dagegen kaum eine immunologische Reaktion im Darm bzw. im Blut beobachtet werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die unterschiedliche Fähigkeit verschiedener *Salmonella*-Serovaren in die Darmwand einzudringen mit der

Stärke der Immunantwort im Gewebe und Blut korreliert. Darüber hinaus scheint die immunologische Reaktion im Blut die Reaktion im Zäkum zu reflektieren.

Vorkommen von gamma/delta T-Zell-Subpopulationen in verschiedenen Organen nach Infektion von Hühnerküken mit *Salmonella* Typhimurium

Pieper, J.*, Methner, U. und Berndt, A.

Bisher ist nur wenig über die Existenz von gamma/delta T-Zell-Subpopulationen und deren Bedeutung im Abwehrgeschehen gegen *Salmonella* (*S.*)-Infektionen beim Huhn bekannt. Zur Untersuchung des Vorkommens von gamma/delta T-Zell-Subpopulationen in verschiedenen aviären Organen wurden Eintagsküken oral mit *S. Typhimurium* (10⁷kbE pro Tier) infiziert und die gamma/delta T-Zellen aus Zäkum, Milz, Thymus und Blut hinsichtlich ihrer Expression verschiedener Oberflächenantigene (CD8 alpha, CD8 beta und CD28) im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren durchflusszytometrisch analysiert.

Ähnlich wie bereits im aviären Blut gefunden, konnten gamma/delta T-Zellen des Zäkums, der Milz und des Thymus anhand der unterschiedlich starken CD8 alpha-Exposition auf der Zelloberfläche in CD8 alpha-starkpositive, CD8 alpha-schwachpositive und CD8 alpha-negative Zellen unterteilt werden. Mit Ausnahme des Thymus erhöhte sich der Anteil der CD8 alpha-starkpositiven gamma/delta T-Zellen infolge der Infektion mit *S. Typhimurium* in allen untersuchten Geweben im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant. Der maximale Anstieg der CD8 alpha-starkpositiven Subpopulation wurde am vierten Tag nach Infektion in der Lamina propria des Zäkums (8fach), in der Milz (5fach) und innerhalb der Blutlymphozyten (4fach) beobachtet. Gleichzeitig verringerte sich der Anteil CD8 beta-exprimierender Zellen innerhalb der CD8 alpha-starkpositiven gamma/delta T-Zellsubpopulation erheblich, wohingegen sich die CD28-Expression in dieser Population nur leicht erhöhte.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse zur differentiellen CD8 alpha-Expression lassen sich aviäre gamma/delta T-Zellen der hier untersuchten Organe in drei Untergruppen einteilen (starkpositiv, schwachpositiv, negativ). Des Weiteren finden sich im Zäkum und der Milz von mit *S. Typhimurium* infizierten Tieren signifikant mehr gamma/delta T-Zellen, welche den CD8 Co-Rezeptor in seiner homodimeren alpha/alpha-Form exprimieren. Das Auftauchen CD8 alpha/alpha-positiver T-Zellen infolge der *S.*-Typhimurium-Infektion wird als Indikator für die Bildung von Effektor/Memory T-Zellen *in vivo* angesehen.

Weitere Projekte

Vergleichende phänotypische und funktionelle Charakterisierung von aviären gamma/delta-T-Zellen

Berndt, A., Pieper, J. und Methner, U.

1.17.3 Immunsystem der Fische – Grundlagenuntersuchungen

Adelmann, M., Bergmann, S.M., Fischer, U.*, Hoffmann, B., Kock, H., Köllner, B., Schütze, H. und Utke, K.

(in Zusammenarbeit mit Lange, B. [Riemser Arzneimittel AG]; Lorenzen, N. [Aarhus, Dänemark]; Ototake, M. [Tamaki, Japan]; Sunyer, O. [Philadelphia, USA] und Weitschies, W. [Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald])

Zellvermittelte Zytotoxizität bei viraler haemorrhagischer Septikämie (VHS) der Forellen

Zytotoxische T-Zellen von Säugern als Teil des adaptiven Immunsystems sind in der Lage, virusinfizierte Zielzellen durch Bindung ihres T-Zellrezeptors (TCR) an klassische, peptidbeladene MHC Klasse I-Moleküle zu erkennen. Unsere bisherigen Studien hatten gezeigt, dass die Allele des einfach dominanten polymorphen klassischen MHC Klasse I Locus Onmy-UBA des Regenbogenforellenkons C25 und der permanenten Regenbogenforellenzelllinie RTG-2 identisch sind. Periphere Blutleukozyten (PBL) von VHS-Virus (VHSV)-infizierten Regenbogenforellen lysierten MHC Klasse I kompatible VHSV-infizierte Zellen und später auch MHC Klasse I inkompatible Zellen. Im Gegensatz zu naiven Fischen zeigten PBL von infizierten Fische auf transkriptionaler Ebene ein hohes CD8 Expressionsniveau, was auf eine

Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen schließen lässt. Durch RT *real time* PCR konnte weiterhin festgestellt werden, dass gleichzeitig die Expression der Gene des *natural killer cell enhancement*-Faktors (NKEF) und des NK-Zellmarkers CD56 erhöht waren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl angeborene als auch adaptive zellvermittelte Immunmechanismen bei der VHS eine Rolle spielen. Die verspätete Lysis von VHSV-infizierten Targetzellen durch NK-ähnliche Zellen steht im Widerspruch zur allgemein akzeptierten Lehrmeinung, dass bei Virusinfektionen der Wirbeltiere angeborene Immunmechanismen die erste Phalanx der Immunabwehr bilden, und eine adaptive Immunantwort erst später ausgeprägt wird. Die späte NK-Zellreaktion war begleitet vom Nachweis VHSV-spezifischer Antikörper. Es kann deshalb vermutet werden, dass es zu einer Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität gekommen ist, und zwar dergestalt, dass NK-Zellen über ihren Fc-Rezeptor virusspezifische Antikörper binden. Das versetzt sie in die Lage, virale Proteine auf der Oberfläche von Zielzellen zu erkennen.

Arbeiten zum CD8 der Forellen

Zur näheren Charakterisierung der adaptiven zellvermittelten Immunantwort benötigen wir Werkzeuge zur Darstellung des T-Zellmarkers CD8. Dazu wurden die Genomabschnitte von CD8 α und CD8 β verschiedener Forellenindividuen sequenziert und mit bereits bekannten DNA-Sequenzen verglichen. Es wurde eine 100%ige Übereinstimmung der jeweiligen CD8 α und CD8 β -Sequenzen bei Regenbogenforellen untereinander festgestellt. Ausgehend von der mRNA-Sequenz von CD8 α wurde in *E. coli* rekombinantes CD8 α -Protein exprimiert und zur Herstellung eines polyklonalen Serums an Kaninchen appliziert. Parallel wurden die Arbeiten zur Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen CD8 der Salmoniden fortgeführt, wobei besonderes Augenmerk auf die verwendeten Screeningsysteme gelegt wurde. Als Ergänzung zum genomischen Expressionsnachweis von CD8 α und CD8 β mittels RT *real time* PCR wurden Arbeiten zur mRNA-*in-situ*-Hybridisierung begonnen.

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung zellulärer Faktoren bei der Immunantwort von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

Fische sind die phylogenetisch ältesten Vertebraten, bei denen ein adaptives Immunsystem existiert. Sowohl zelluläre Immunfunktionen durch thymusabhängige T-Lymphozyten als auch eine humorale Immunantwort durch B-Lymphozyten wurden nachgewiesen. Faktoren, wie Temperatur, Jahreszeit und Sexualzyklus beeinflussen die Antikörperbildung poikilothermer Fische. Die Induktion einer humoralen Immunantwort, insbesondere nach viraler Infektion bzw. Immunisierung mit viralen Antigenen, korreliert nicht immer mit einer belastbaren Immunität. Zelluläre Abwehrmechanismen sind hierbei wahrscheinlich von wesentlicher Bedeutung.

In Tierversuchen wurde gezeigt, dass VHSV-infizierte Zellen durch sensibilisierte Lymphozyten lysiert werden. Dieser Prozess ist sowohl MHC Klasse I restringiert als auch nicht-restringiert, was auf eine Beteiligung von NK-Zellen schließen lässt. Eine Beteiligung von TCR+, CD8+ und sIgM sowie von Zytokinen der T Helfer-Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen. Funktion und Einfluss dieser Faktoren sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Zur funktionellen Charakterisierung verschiedener T-Zellmarker sollen geeignete Antikörper hergestellt werden. Die entsprechenden Gene wurden in einen modifizierten pcDNA6V5-His Vektor kloniert. Ein dem Gen vorgeschaltetes Signalpeptid des MHC I Moleküls vom Huhn bewirkt die Lokalisierung des Expressionsproduktes auf der Zelloberfläche. N-terminal befindet sich ein FLAG Epitop, das nach Expression extrazytoplasmatisch lokalisiert ist und zum Nachweis der Expression dient. Folgende Gene der Regenbogenforelle wurden bereits kloniert: CD 8 alpha, CD 9; CD 28, CD 36, CD 59, CD 63, CD 83, CD 121, CD 209, CRTCP (zytotoxisches und regulierendes T cell Protein), TCR alpha (T-Zell Rezeptor alpha), TCR beta (T-Zell Rezeptor beta).

2 BAKTERIEN

2.1 ESCHERICHIA COLI (E. COLI)

Shiga-Toxin produzierende *E. coli* (STEC)/Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Geue, L.*

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 (HUS) entstehen können.

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 der Variante Stx1c sowie verschiedenen Shiga-Toxin 2 (Stx2)-Varianten, 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, O159 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*, *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 Cluster-Analysen konnte gezeigt werden, dass auch innerhalb der einzelnen klonalen Gruppen über die Zeit genetische Veränderungen stattfinden. Mögliche Hinweise auf Ursachen für das Verschwinden von klonalen Gruppen aus den Rinderherden wurden diskutiert.

Einfluss von unterschiedlichen Fütterungsstrategien auf die quantitative und qualitative Zusammensetzung der mikrobiellen Enddarmflora bei Rindern (unter besonderer Berücksichtigung von STEC/EHEC)

Geue, L.*, Schrödel, W. und Krüger, M.

Unsere Untersuchungen in Rinderbeständen sind darauf ausgerichtet, den Einfluss unterschiedlicher Fütterungsstrategien auf die Häufigkeit von *Escherichia coli* und insbesondere von STEC/EHEC zu untersuchen sowie die qualitativen und quantitativen Verhältnisse in der Enddarmflora zu charakterisieren. Dazu wurden zwei Gruppen von Hochleistungs-Milchkühen mit gleichem Laktationsstatus ausgewählt. Eine Gruppe wurde kraftfutterreich gefüttert, die zweite Gruppe auf rohfaserreiche Fütterung (Silagefütterung) umgestellt. Über einen Zeitraum von drei Monaten wurden im wöchentlichen Abstand Kot- und Blutproben zur anschließenden mikrobiologischen und immunologischen Untersuchung genommen. Für die Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl bzw. von verschiedenen Bakterienclustern wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH-Technik) mit anschließender mikroskopischer Auszählung angewandt. Die Ergebnisse sind kritisch zu bewerten, weil sich eine Validierung der Methode als problematisch darstellt (fehlende Goldstandards). Die Amplifikation von Fragmenten der V1 und V2-Region von bakterieller rRNA mit anschließender TGGE wurde für die qualitative Charakterisierung etabliert. Klassische Keimzählverfahren mit anschließender Koloniehybridisierung (Detektion von *stx*- bzw. *eae*-Genen) wurden für die Quantifizierung und Charakterisierung von u.a. *E. coli* genutzt.

Weitere Projekte

Sequenzierung und Strukturanalyse der Pathogenitätsinsel (PAI) des Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) O156:H25 Stammes Wus 02/09/010-1 isoliert aus einem Rind

Geue, L., Jores, J. und Wieler, L.H.

Epidemiologische Untersuchungen zu einer Salmonellen-Epidemie bei Diensthunden

Schotte, U. und Geue, L.

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.

Dynamics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from German cattle between birth and slaughter

Döpfer, D., Geue, L., de Bree, J. und de Jong, M.C.M.

2.2 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.

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

Henning, K.*

Chlamydien sind als Erreger der verschiedensten Erkrankungen bei Haustieren sowie beim Menschen bekannt. Weniger bekannt ist, dass diese Erreger auch spontan in Versuchstierbeständen vorkommen

können. Aus verschiedenen Organen zweier Albino-Ratten, die während eines Tierversuchs gestorben waren, wurden mit Hilfe der Zellkultur Chlamydien isoliert. Am Standort Jena des FLI konnten die Isolate mittels PCR und Sequenzierung als *Chlamydomphila psittaci* identifiziert werden. Hieraus ergeben sich insbesondere zwei Schlussfolgerungen: Bei *Chlamydomphila psittaci* handelt es sich um einen Zoonosen-Erreger und eine Infektion von Versuchstieren mit diesem Erreger bedeutet eine potentielle Gefährdung des Personals. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass eine Infektion mit Chlamydien einen Einfluss auf das Ergebnis des Tierversuchs gehabt haben könnte. Hieraus kann gefolgert werden, dass Versuchstiere regelmäßig mit geeigneten Mitteln (z.B. PCR) hinsichtlich Chlamydien-Infektionen kontrolliert werden sollten.

Der Erreger des Q-Fiebers, *Coxiella burnetii*, ist ein sehr kleines, gramnegatives, obligat intrazelluläres Bakterium. Der Erreger hat ein breites Wirtsspektrum, ist aber insbesondere bei Zecken sowie als Abort-erreger bei Wiederkäuern von Bedeutung. Der Erreger wird unter anderem über das Fruchtwasser und die Nachgeburt ausgeschieden. Auch eine Ausscheidung über die Milch ist bekannt. Während in den vergangenen Jahren der Coxiellen-Nachweis in Milchproben lediglich mittels PCR erfolgreich war, die parallel hierzu angelegten Zellkulturen dagegen negativ blieben, konnte im abgelaufenen Berichtsjahr erstmals aus Coxiellen-PCR-positiven Milchproben der Erreger angezüchtet werden, d.h. die Milchproben enthielten vermehrungsfähige Coxiellen. Dieses Ergebnis, das insbesondere Bedeutung für die Herstellung von Rohmilchprodukten hat, sollte hinsichtlich des Verbraucherschutzes Beachtung finden.

Durch den Einsatz der Zellkultur im Rahmen der Coxiellen-Diagnostik werden gelegentlich auch Erreger isoliert, über deren Vorkommen in Deutschland wenig bekannt ist. Während einer Studie zu Q-Fieber in Nordrhein-Westfalen konnte aus einem Pool von Ixodes-Zecken ein Erreger isoliert werden, der in der Zellkultur ein Coxiellen-ähnliches Erscheinungsbild, d.h. ein Wachstum in intrazytoplasmatischen Vakuolen, ergab, in den färberischen Eigenschaften sowie in der Vermehrungsdynamik aber von Coxiellen deutlich abwich. Mittels Sequenzierung konnte dieser Erreger als Angehöriger der Gattung *Spiroplasma* identifiziert werden. Bei den Spiroplasmen handelt es sich um helikale Mycoplasmen, die in erster Linie in Pflanzen und Arthropoden, u.a. in Zecken, gefunden werden. Einige *Spiroplasma*-Spezies werden als potentielle Pathogene für Vertebraten diskutiert. Der Umstand, dass das genannte Isolat in der Lage ist, sich bei 35°C im Zytoplasma von Säugetierzelllinien zu vermehren, kann als Hinweis gedeutet werden, dass es für Wirbeltiere pathogen sein könnte.

Optimierter DNA-Mikroarraytest ermöglicht Nachweis und Genotypisierung einzelner PCR-amplifizierbarer Ziel-DNA-Kopien

Ehricht, R., Slickers, P., Goellner, S., Hotzel, H. und Sachse, K.*

Ziel der Studie war die Bestimmung der Nachweisgrenze eines optimierten DNA-Mikroarraytests zum Nachweis und zur Spezies-Identifizierung von Chlamydien. Die Untersuchung von Verdünnungsreihen eines Plasmid-Standards mit der Zielsequenz aus *Chlamydia (C.) trachomatis* sowie genomischer DNA dieses Bakteriums zeigte, dass eine einzige PCR-amplifizierbare Kopie der Ziel-DNA für ein spezifisches Hybridisierungsmuster ausreicht. Angesichts dieses Leistungsvermögens kann der Test als geeignet für die Routinediagnostik angesehen werden.

Zur Bestimmung der Sensitivität des Mikroarray-Assays untersuchten wir 10fache Verdünnungsreihen des rekombinanten Plasmids pCR2.1-TOPO+DC38, welches ein 1086 bp langes Insert mit der 3'-Domäne des 16S rRNA-Gens, dem intergenischen Spacer und Domäne I des 23S rRNA-Gens von *C. trachomatis* trägt. Dabei erwies sich eine einzige Kopie als ausreichend, um nach der PCR-Amplifikation ein Spezies-spezifisches Hybridisierungsmuster auf dem Mikroarray zu erzeugen. Eine analoge Testserie mit chromosomaler DNA von *C. trachomatis* ergab eine Nachweisgrenze von etwa 0,05 fg DNA, einem Äquivalent von 56 Genomkopien bzw. 1,87 Einschluss-bildenden Einheiten. Die Tatsache, dass sowohl auf dem Mikroarray als auch mittels *real-time* PCR chromosomale DNA mit niedrigerer Sensitivität als das Plasmid detektiert wurde, zeigt an, dass die Anzahl der wirklich amplifizierbaren Ziel-DNA-Kopien hier niedriger war als die Gesamtzahl der vorhandenen Genomkopien.

Die entscheidenden Voraussetzungen für das Erreichen dieser hohen Sensitivität des AT-Mikroarraytests waren: 1. Ein effizientes Sonden-Design, gepaart mit der Harmonisierung der Schmelztemperaturen über die G+C-Werte, 2. Die Erhöhung der PCR-Produktausbeute im Ergebnis der Einführung eines neuen Primerpaars, welches die Amplikonlänge von 1 kbp auf 176 bp ohne Einbußen beim diskriminatorischen Potential reduzierte und 3. Die Sichtbarmachung der hybridisierenden Duplices durch Enzym-katalysierte TMB-Präzipitation.

Charakterisierung des Persistenzzustandes von *Chlamydomphila psittaci* auf der Ebene der Transkription

Goellner, S., Schubert, E., Liebler-Tenorio, E., Hotzel, H., Saluz, H.P. und Sachse, K.*

Im Verlaufe ihres zweiphasigen Entwicklungszyklus sind die Chlamydien in der Lage, auf intrazelluläre Umweltänderungen wie Nährstoffmangel (Aminosäuren, Eisen), Antibiotikabehandlung oder Zytokin-Exposition (IFN- γ , TNF- α) zu reagieren, indem sie unter Änderung der typischen Morphologie in den persistenten Zustand übergehen. Dieser reversible Zustand ist mit einer Reihe von chronischen Chlamydienerkrankungen in Verbindung gebracht worden. Die der Entwicklung einer persistenten Infektion und der resultierenden Pathologie zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig erforscht.

In einigen Studien aus der Literatur konnten bereits für *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydomphila (Cp.) pneumoniae* Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen akuter und persistenter Infektion gezeigt werden. Dagegen gibt es für *Cp. psittaci*, ein zoonotisches Agens und Erreger mit breitem Wirtsspektrum, noch keine vergleichbaren Daten. Daher hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, die transkriptionellen Unterschiede zwischen akuter und persistenter *Cp.-psittaci*-Infektion herauszuarbeiten und so eine detaillierte Einsicht in die molekularen Prozesse während der Herausbildung und Aufrechterhaltung der Persistenz zu gewinnen.

Monolayers von Hep-2-Zellen wurden mit *Cp. psittaci* DC15 infiziert (MOI=1) und mit IFN- γ (20 ng/ml), DAM (150 μ M) oder Penicillin G (200 U/ml) behandelt, um Persistenz zu induzieren. Akute, nicht behandelte Infektionen dienten als Kontrolle. An vier Zeitpunkten im Verlaufe der Inkubation (12, 24, 36 und 48 h p.i.) wurde Total-RNA isoliert und revers transkribiert. Es wurden 27 Chlamydiengene untersucht, die Membranproteine bzw. Stress-Response-Proteine kodieren, oder auch in Transkriptionsregulation, Signaltransduktion und RK-EK-Differenzierung involvierte Proteine. Die Regulation auf Transkriptionsebene wurde mittels quantitativer *real time* PCR (qrtPCR) charakterisiert. Beginnend bei 24 h p.i. zeigten die qrtPCR-Messungen die Herunterregulation der mRNAs für verschiedene Membranproteine (*omcB*, *omcA*, *pomp*), Sigma-Faktoren (*sigA*, *sig28*, *sig54*), eines Zellteilungsproteins (*ftsW*) und der RK-EK-Differenzierungsproteine (*ctcB*, *ctcB*) in allen drei Persistenzmodellen, wobei der Zustand bis 48 h p.i. aufrecht erhalten wurde. Des Weiteren war die Herunterregulation des Transkripts für CADD (chlamydia protein associating with death domains) charakteristisch für alle drei Modelle zum Zeitpunkt 48 h p.i. Andererseits wurden bei anderen Chlamydiengenen beträchtliche Unterschiede in den transkriptionellen Response-Mustern zwischen den Modellsystemen festgestellt. Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Persistenz von *Cp. psittaci* durch unterschiedliche induzierende Faktoren erreicht werden kann, und dass die Herunterregulation von mRNAs der genannten Gene mit der Herausbildung und Aufrechterhaltung des Persistenzzustandes *in vitro* assoziiert ist.

Weitere Projekte

Molekulare Pathogenese von Chlamydien-assoziierten Erkrankungen des Rindes

Sachse, K., Schubert, E., Müller, W. und Reinhold, P.

Bedeutung der Chlamydien für Fruchtbarkeitsstörungen bei Schweinen

Melzer, F., Kauffold, J., Hotzel, H., Berndt, A., Reinhold, P. und Sachse, K.

Erregerreservoirs und zoonotische Bedeutung von Chlamydien

Reinhold, P., Sachse, K., Schubert, E. und Hotzel, H.

2.3 MYKOBAKTERIEN

2.3.1 Tuberkulose

Mykobakterien-Infektionen bei wild lebenden und in Gehegen gehaltenen Zerviden

Moser, I.*, Hotzel, H., Kroschewski, K., Schettler, E. und Fröhlich, K.

Die Rindertuberkulose, eine anzeigepflichtige Tierseuche, hervorgerufen durch *Mycobacterium bovis*, ist in Deutschland seit vielen Jahren getilgt. Dennoch treten jährlich sporadische Krankheitsfälle beim Rind auf, deren Ursprung meist nicht geklärt werden kann. Der Erreger verfügt über ein breites Wirtsspektrum, das viele warmblütige Tierspezies und auch den Menschen umfasst. Um die Rolle von Wildtieren im Infektionskreislauf zu klären, wurden über 1.000 wild lebende und in Gehegen gehaltene Zerviden aus nahezu allen Bundesländern auf das Vorkommen von Mykobakterien untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass nach Möglichkeit die Regionen, in welchen während der letzten zehn Jahre Tuberkulosefälle beim Rind aufgetreten waren, durch die laufende Untersuchung abgedeckt waren. Bei etwa 18 % der Zerviden wurden Mykobakterien isoliert. Der überwiegende Anteil (90 %) war dem MAIC (*M. avium-intracellulare*-Komplex) zuzuordnen. Die am häufigsten isolierte Spezies war *M. avium* ssp. *hominissuis* mit ca. 67 %, die Spezies, die auch beim Menschen für den überwiegenden Teil der Infektionen durch atypische Mykobakterien verantwortlich ist. *M. avium* ssp. *paratuberculosis* wurde nur in wenigen Fällen isoliert. Etwa 10 % gehörten zu anderen atypischen Mykobakterienspezies, *M. bovis* wurde jedoch bei wild lebenden Zerviden nicht gefunden. Bei Gehegetieren wurde in einem Fall *M. bovis* isoliert.

Epidemiologie der Tuberkulose bei Zootieren

Moser, I.*, Hotzel, H., Seidler, T., Ellenberger, C., Hetzel, U., Bakker, D., Prodingler, W.M., Moisson, P., Gomis, D., Wuennemann, K.

Die Erreger der Tuberkulose, eine Gruppe sehr eng miteinander verwandter Mykobakterienspezies, sind taxonomisch im *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTC) zusammengefasst. Die Namensgebung erfolgt bei den einzelnen Spezies nach ihrem Primärwirt bzw. nach der Tierart, bei welcher der Erreger erstmals beschrieben wurde. Dennoch ist das Wirtsspektrum und die zoonotische Potenz für alle Erreger des MTC sehr breit. Zoo- und Gehegetiere verschiedenster Spezies können sich infizieren und daher auch für den Menschen ein Infektionsrisiko darstellen. Unter diesem Aspekt wurde die Infektionskette ausgehend von einem Fall von Tuberkulose bei einer Robbe, hervorgerufen durch *Mycobacterium pinnipedii*, in einem zoologischen Garten über mehrere Jahre verfolgt. Der Ausgangspunkt der Infektion blieb unklar, eine Einschleppung durch den Zukauf eines Wildfanges wurde vermutet. Die Infektion blieb zunächst über mehrere Jahre auf die Robbenkolonie begrenzt, wobei es nur sporadisch, in größeren Zeitabständen, zu Todesfällen kam. Der Erreger breitete sich dann auf das angrenzende Kamelgehege aus und führte auch dort zum Tod eines Tieres. Kurz darauf kam es auch im nahe gelegenen Tapirgehege zur Infektion mindestens eines Tieres. Diese führte jedoch erst nach Verkauf des Tieres zur offenen Tuberkulose, wodurch zwei weitere Tapire am neuen Standort ebenfalls erkrankten und getötet werden mussten bzw. starben. Aus all diesen Tieren wurde die gleiche Erregerspezies isoliert. Durch molekulare Feintypisierungsmethoden, wie Spoligotypisierung und MIRU-Typisierung, konnte auch die Identität verschiedener molekularer Charakteristika unterhalb der Speziesebene nachgewiesen werden, so dass die enge klonale Verwandtschaft der Isolate gesichert ist. Für *M. pinnipedii* wurde erstmals die pathogenetische Bedeutung für Kamele und die Ausbreitung innerhalb einer Tapirgruppe nachgewiesen. Die Ausbreitung in den verschiedenen Gehegen wurde möglicherweise durch das Reinigungsregime im Robbenpool unterstützt, wobei es zu Aerosolbildung kam und Tiere in angrenzenden Gehegen infiziert wurden. Der Ausbruch der Erkrankung bei den einzelnen Tieren scheint stark von der individuellen Stressbelastung abhängig gewesen zu sein. Bei Kontaktpersonen konnte bisher kein Indiz für eine Infektion des Menschen im Rahmen dieser Infektkette nachgewiesen werden. Ob sich durch die Passage über verschiedene Tierarten eine Änderung der Virulenz ereignet hat, ist bisher nicht geklärt. Dies soll Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Weitere Projekte

Molekulare Epidemiologie der Tuberkulose beim Rind

Moser, I. und Hotzel, H.

Verbesserung der molekularen Diagnostik der Tuberkulose beim Rind mittels *real time*-PCR

Moser, I.

Nachweis von Erregern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes bei Haustieren

Moser, I., Peters, M. und Hewicker-Trautwein, M.

2.3.2 Paratuberkulose

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) ist der Erreger der Paratuberkulose, einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung der Haus- und Wildwiederkäuer. *Map* gehört dem *Mycobacterium-avium*-Komplex (MAC) im Genus *Mycobacterium*, Familie *Mycobacteriaceae*, an. Es handelt sich um pleomorphe (kokken-, hantel- oder keulenförmig), gerade, gebogene, geknickte, z.T. granuliert unbewegliche säurefeste Stäbchen von 0,3 – 2,0 µm Länge und 0,3 – 0,5 µm Dicke. *Map* wächst äußerst langsam und benötigt Mycobactin als Zusatz zu den Kulturmedien.

Das Genom von *Map* wurde kürzlich vollständig sequenziert. Es hat eine Größe von ca. 4,83 Mb mit einem GC-Anteil von 69,3 %. Die Sequenzhomologie zu *Mycobacterium avium* subsp. *avium* beträgt > 97 %. Für die molekularbiologische Diagnostik wurde bisher vor allem die Existenz eines *Map*-spezifischen Insertionselementes (IS900) ausgenutzt, in der Zwischenzeit konnten jedoch weitere spezifische Sequenzabschnitte identifiziert werden. *Map* besitzt eine Reihe biologisch aktiver Zellwandkomponenten, die bei anderen pathogenen Mykobakterien ebenso vorkommen, so z.B. Lipoarabinomannan (LAM), Cord-Faktor, Superoxid-Dismutase und andere. *Map*-spezifische Virulenzfaktoren wurden bisher wenig beschrieben.

Grenzen der Aussagefähigkeit bei der Kombination serologischer Tests auf Paratuberkulose

Böttcher, J., Geue, L., Hoffmann, D., Köhler, H.* und Ziller, M.

Die zugelassenen serologischen Tests auf Paratuberkulose-Antikörper sind durch sehr geringe Sensitivitäten gekennzeichnet. Eine alternative bakteriologische Kotuntersuchung ist kostenintensiv und zeitaufwändig. Deshalb sollte die prädiktive Kapazität der Kombination verschiedener serologischer Tests durch eine mathematische Analyse der Vorhersagefehler abgeschätzt werden.

In der Untersuchung eigener Daten und dem Vergleich mit Daten einer Studie des Bayerischen Tiergesundheitsdienstes wurden unterschiedliche Test-Kombinationen betrachtet. In den bisherigen Analysen konnten bei kombinierter Testung Sensitivitäten bis ca. 65-70% bei leicht verschlechterter Spezifität erreicht werden. Dies ist zwar eine Verbesserung gegenüber einem einzelnen Test, reicht jedoch für die praktische Diagnostik bei der Bekämpfung der Paratuberkulose nicht aus.

Eignung des Antikörpernachweises gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) in Sammelmilch- bzw. Tankmilchproben zur Herdendiagnostik der Paratuberkulose

Köhler, H.*

Die tatsächliche Verbreitung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Deutschland kann derzeit nur geschätzt werden, exakte epidemiologische Daten dazu liegen nicht vor. Genaue Kenntnisse zur Prävalenz der Erkrankung sind jedoch Voraussetzung für die Erarbeitung eines nationalen Bekämpfungsprogrammes. Bei anderen Tierseuchen stellt der Antikörpernachweis in Sammelmilch- oder Tankmilchproben ein geeignetes Verfahren für die Überwachung und Prävalenzerhebung dar. Es erweist sich als vorteilhaft, dass praktisch alle Milchviehbestände mit vertretbarem logistischem Aufwand und vergleichsweise niedrigen Kosten erreicht werden können. Aus diesen Gründen wäre eine derartige Herangehensweise auch für eine nationale Erhebung der Prävalenz der Paratuberkulose interessant. In Deutschland

stehen zwei ELISAs zur Verfügung, die für den Nachweis von Antikörpern gegen *Map* in Milchproben zugelassen sind (Institut Pourquier, SVANOVA).

Im Gegensatz zu hochkontagiösen Tierseuchen breitet sich die Paratuberkulose nur langsam im Bestand aus. In der Regel ist auch nur ein Teil der Tiere infiziert. Eine Serokonversion tritt erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium und nicht bei allen Tieren auf. Der Anteil serologischer Reagenten im Bestand ist äußerst unterschiedlich und hängt von vielen Faktoren ab.

In einer experimentellen Studie wird derzeit untersucht, ob mittels Sammelmilch-ELISA eine sichere Erkennung Paratuberkulose-positiver Herden möglich ist und inwieweit Rückschlüsse auf die wahre Prävalenz der Erkrankung in der Herde gezogen werden können.

Drei große Milchviehbestände mit einer unterschiedlichen Paratuberkulose-Prävalenz (hohe und mittlere Prävalenz, unverdächtig) sind in die Studie einbezogen. Im Abstand von ca. sechs Monaten werden Kotproben, Blutserum und Milchproben von allen laktierenden Kühen gewonnen. Es erfolgt der kulturelle Erregernachweis im Kot sowie der Antikörpernachweis im Serum und in der Milch der Einzeltiere jeweils mit zwei verschiedenen ELISAs (Pourquier, Svanova). Parallel dazu werden von 50 Tieren Sammelmilchproben aus Einzelmilchproben gleichen Volumens hergestellt und ebenfalls mit Hilfe der beiden ELISAs untersucht.

Die bisherigen Ergebnisse der Studie beruhen auf 46 Poolproben und den zugrunde liegenden Einzeltierbefunden. Sie lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Bei Verwendung des SVANOVA-ELISA lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe des prozentualen Probenwertes der Poolproben und der Prävalenz der Erkrankung in den Herdenbeständen der Einzeltiergruppen erkennen. Es ergibt sich auch kein Zusammenhang zwischen der Höhe des prozentualen Probenwertes und dem aktuellen Anteil an *Map*-Ausscheidern in den Tiergruppen, die den Poolproben zu Grunde liegen.

Beim Pourquier-ELISA liegen die prozentualen Probenwerte der Poolproben aus dem hoch prävalenten Bestand höher als die der Poolproben aus dem unverdächtigen Bestand. Die ELISA-Werte der Sammelmilchproben aus dem Bestand mit mittlerer Paratuberkulose-Prävalenz weisen eine große Streubreite auf und es lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe des prozentualen Probenwertes der zugehörigen Poolprobe und dem aktuellen Prozentsatz an *Map*-Ausscheidern in der Tiergruppe ermitteln.

Nach gegenwärtigem Stand der Ergebnisse erlaubt die Untersuchung von Sammelmilchproben mit Hilfe des Pourquier-ELISA die Erkennung von Beständen mit hoher Paratuberkulose-Prävalenz. Die Festsetzung von Cut-off-Werten zur eindeutigen Unterscheidung zwischen positiven und negativen Herden bzw. zur Abschätzung der Inner-Herden-Prävalenz ist äußerst problematisch.

Vergleich verschiedener PCR-Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Möbius, P.*, Hotzel, H., Raßbach, A. und Köhler, H.

Die derzeit sensitivste Methode zur Detektion von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) in der Routinediagnostik mit der gleichzeitig höchst möglichen Spezifität ist die kulturelle Anzucht auf Mykobaktin enthaltenden festen Nährmedien. Dabei stellt die lange Anzuchtzeit des Erregers in der Praxis ein großes Problem dar. Auf Grund der nicht ausreichenden Sensitivität bei Direktisolierung von *Map* kann bisher noch keine andere Methode die Anzucht ersetzen. Als ein Weg zur Verkürzung der Nachweiszeit wird das Abspülen von Kulturen in der frühen Wachstumsphase mit nachfolgendem molekularbiologischem Erregernachweis angesehen. Für den molekularbiologischen Nachweis von *Map* werden weltweit verschiedene PCR-Systeme mit unterschiedlichen Targetregionen und Primersequenzen verwendet. Dabei dienen hauptsächlich Genomabschnitte des Spezies-spezifischen Insertionselementes IS900 als Zielsequenz. Es wurden aber auch andere für *Map* spezifische Sequenzen identifiziert und für die Diagnostik vorgeschlagen.

Im Rahmen der von uns durchgeführten PCR-Studie wurden acht „single“ und fünf „nested“-PCR-Systeme unter Verwendung von zwölf verschiedenen Primerpaaren und basierend auf den Zielsequenzen IS900, IS*Mav*2, f57 und dem Locus 255 bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht und verglichen. Um experimentell die Spezifität der gewählten Primerpaare und PCR-Systeme zu bestimmen, wurden insgesamt 41 Typenstämmen und Feldisolaten der Spezies *Mycobacterium avium* (*M. a.*) subsp. *paratuberculosis*, *M. a.* subsp. *avium*, *M. a.* subsp. *hominissuis*, sowie anderer bei Rindern nachgewiesener Mykobakterienspezies getestet. Zusätzlich wurden 15 weitere Typenstämmen von bei Rindern vorkommenden pathogenen Bakterienspezies und Kommensalen in die Untersuchungen einbezogen.

In Abhängigkeit von den spezifischen Primerpaaren war mit allen „single“-PCR-Systemen ein Nachweis von 1 pg bis 100 fg *Map*-DNA pro Ansatz möglich. Alle „nested“-PCR-Systeme zeigten eine mindestens 10fach höhere Sensitivität, die Nachweisgrenze lag bei 10 fg, teilweise war ein Nachweis bis zu 1 fg möglich, das entspricht etwa einer Genomkopie.

Die Spezifität der getesteten PCR-Systeme war unterschiedlich. In Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Konzentration und der jeweiligen Bakterienspezies wurden bei zwei von acht „single“-PCR-Systemen und drei von fünf „nested“-PCR-Systemen Kreuzreaktionen mit einer bis zu vier Bakterien-spezies nachgewiesen. Eine hohe Anzahl von Nebenprodukten wurde bei drei „single“-PCR-Systemen mit den Zielsequenzen IS*Mav*2 (teilweise ab 0,01 ng), IS*900* (100 ng) und Locus 255 (100 ng) detektiert, jedoch nie für die DNA der getesteten *Map*-Stämme. Nebenprodukte würden bei Methoden, die mit unspezifischen Sonden arbeiten, wie z.B. der Verwendung von SybrGreen, zu falschen Ergebnissen führen. Bei den „nested“-PCR-Systemen traten keine Nebenprodukte auf. Trotz strenger räumlicher Trennung der einzelnen Arbeitsschritte kam es bei der Durchführung der verschiedenen „nested“-PCRs immer wieder zu Kontaminationen. Eine Anwendung dieser Methoden in der Routinediagnostik erscheint uns deshalb als ungeeignet. Für einen spezifischen Nachweis von *Map* mittels PCR können wir vier Primerpaare für „single“-PCRs empfehlen, für die keine Kreuzreaktionen sowie keine oder nur vereinzelt Nebenprodukte (erst beim Einsatz hoher DNA-Konzentrationen) nachgewiesen werden konnten und die sich mit einer Nachweisgrenze von 100 fg genomischer DNA pro PCR-Ansatz bei uns als am sensitivsten erwiesen: Für die Zielregion IS*900* waren dies die Primer von Schneider (2003, Dissertation München), Benazzi *et al.* (Tagungsbericht des 21. Kongresses der DVG 1995; Bd.2, S.170-178) und Englund *et al.* (Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1999; 33, 163-171), basierend auf der Zielregion f57 die Primer von Vansnick *et al.* (Vet Microbiol. 2004; 100:197-204).

Weitere Projekte

Einarbeitung und Validierung von direkten und indirekten Methoden zur Diagnostik der Paratuberkulose

Köhler, H. und Möbius, P.

Molekulare Epidemiologie von *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Möbius, P. und Köhler, H.

Die Pathogenese der Paratuberkulose und chronischer entzündlicher Darmerkrankungen

Borrmann, E., Gottschaldt, J., Möbius, P. und Köhler, H.

Validierung eines Milch-ELISA zur Einzeltierdiagnose der Paratuberkulose bei Milchrindern

Köhler, H.

2.4 CAMPYLOBACTER

Molekularbiologische Charakterisierung von *Campylobacter-jejuni*-Isolaten

Müller, J.*, Schulze, F., Hänel, I. und Hotzel, H.

Motilität, Chemotaxis, Kolonisationsfähigkeit, Adhäsion an intestinale Zellen, Invasion und epitheliale Translokation, intrazelluläres Überleben sowie die Bildung von Toxinen gehören zu den Virulenzeigenschaften von *Campylobacter jejuni*. Durch den Einsatz von Knock-out-Mutanten in Küken-Kolonisations-Modellen und Zellkultur-Invasions-Modellen konnten verschiedene Gene identifiziert werden, welche mögliche Virulenzdeterminanten kodieren.

In elf *Campylobacter-jejuni*-Isolaten mit unterschiedlichen Kolonisations- und Invasionsfähigkeiten wurden 20 potentielle Virulenzgene mittels PCR untersucht. Die Mehrzahl der Gene wurde in allen Isolaten nachgewiesen. Dazu gehörten die Gene des Flagellen-Sekretionsapparates *flhA*, *flhB*, *flgB*, *flgE2*, die Flagellin-Gene *flaA* und *flaB*, Invasions-assoziierte Gene (*ciaB* und *iamA*), die Toxin-Gene *cdtA-C*, das Gen *cadF*, dessen Produkt an der Adhäsion beteiligt ist, sowie Gene, deren Produkte am Kolonisationsprozess beteiligt sind (*docA*, *docB*).

Das Plasmid-Gen *virB11* wurde in keinem der untersuchten Stämme gefunden.

Spezifische Unterschiede wurden bei der Untersuchung der Gene *cgfB* und *wlaN*, welche beide eine β -1,3-Galaktosyltransferase kodieren und an der Lipooligosaccharid-(LOS)-Biosynthese beteiligt sind, nachgewiesen. Das Gen *cgfB* wurde nur in drei von fünf Isolaten mit großer Kolonisations- und Invasionsfähigkeit gefunden. Möglicherweise kann *wlaN* das Fehlen von *cgfB* in den zwei *cgfB*-negativen Isolaten ausgleichen.

Allerdings wurde das Gen *wlaN* auch in Isolaten gefunden, die keine Fähigkeit zu Kolonisation und Invasion besaßen. Innerhalb des *wlaN*-Genes gibt es einen hypervariablen Sequenzbereich, welcher einen spezifischen Einfluss auf die Genexpression hat. Entsprechende Varianten bewirken einen Wechsel des Leserahmens und damit die Expression von intakten oder veränderten Proteinen. Sequenzanalysen in Isolaten ohne Kolonisations- und Invasionsfähigkeit bestätigten *wlaN*-Varianten, die verkürzte und damit inaktive Proteine kodierten. In Isolaten mit großer Kolonisations- und Invasionsfähigkeit wurden *wlaN*-Varianten gefunden, welche das intakte Protein kodierten.

In den weiterführenden Arbeiten soll die Anzahl der Isolate erweitert werden, um die Allgemeingültigkeit des Phänomens zu überprüfen.

***Campylobacter*-induzierte Bildung von Interleukin-8 mRNA in primären intestinalen Kükendarmzellen und humanen intestinalen Epithelzellen**

Borrmann, E.* und Hänel, I.

Thermophile *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*) besiedeln den intestinalen Trakt beim Geflügel ohne klinische Erkrankungen hervorzurufen. Kürzlich veröffentlichte *In-vitro*-Untersuchungen zeigten jedoch, dass *Campylobacter*-Stämme zur Induktion der Bildung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in aviären Zellen (Makrophagen, Nierenzellen) befähigt sind (Smith et al. 2005).

Das Ziel unserer Arbeiten war zu prüfen, ob *Campylobacter*-Stämme die Bildung proinflammatorischer Chemokine, insbesondere Interleukin-8 (IL-8), in aviären Darmzellen induzieren können. Dazu wurden acht aus Putenschlächtkörpern isolierte *Campylobacter*-Stämme (6 *C. jejuni*, 2 *C. coli*) geprüft, deren Virulenzeigenschaften wie Toxinbildung und Invasionsvermögen in Caco-2-Zellen bestimmt worden waren. Die primären Kükendarmzellen (PIC) wurden aus 1-Tagesküken isoliert und immunhistologisch durch den Nachweis von Cytokeratin mittels monoklonaler Antikörper charakterisiert. Sie waren über zehn Passagen lebensfähig.

Nach einer 3-stündigen Inkubation der PIC-Zellen mit den *Campylobacter*-Isolaten und anschließendem intensivem Waschen wurden die Zellen weitere 1 h, 5 h und 21 h im Zellkulturmedium kultiviert. Die Bestimmung der induzierten IL-8 mRNA erfolgte nach Isolierung der RNA aus den Zellpellets mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse wurden mit den an humanen intestinalen Darmepithelzellen (INT 407) erhaltenen verglichen. Es wurden sowohl Unterschiede als auch gleichartige Reaktionen bei beiden Zellen festgestellt. Beide Zellarten produzierten signifikant mehr IL-8 mRNA nach Stimulierung mit den *Campylobacter*-Isolaten als die jeweiligen unbehandelten Zellen. Beide Zellen unterschieden sich jedoch im zeitabhängigen Verlauf der IL-8 mRNA-Bildung. Das Mitogen Phorbolmyristatacetat (PMA) induzierte in INT 407-Zellen eine starke Erhöhung der Konzentration von IL-8 mRNA im Vergleich zur Zellkontrolle. Die Kükenzellen reagierten jedoch nicht auf PMA. In INT 407-Zellen produzierten die *C. coli*-Isolate signifikant mehr IL-8 mRNA als die *C. jejuni*-Isolate nach 24 h. In PIC-Zellen konnten diese Unterschiede nicht nachgewiesen werden. In beiden Zellen induzierte der Stamm av 322 B die höchste IL-8 mRNA-Menge innerhalb der *C. jejuni*-Isolate. Dieser Stamm bildet das Cytolethal Distending Toxin (CDT) und invadiert in Caco-2-Zellen. Die Beteiligung von CDT und Invasion an der Bildung von IL-8 in humanen Zellen sind beschrieben. Damit könnten beide Virulenzeigenschaften die Ursache für den signifikant höheren IL-8-mRNA-Gehalt induziert von *C. jejuni* av 322 B im Vergleich zu den anderen *C. jejuni*-Isolaten in beiden Zellen sein. Unsere Ergebnisse zeigen, dass *Campylobacter*-Stämme zur Induktion proinflammatorischer Chemokine auch in aviären intestinalen Zellen befähigt sind.

Smith, C.K., Kaiser, P., Rothwell, L., Humphrey, T., Barrow, P.A., Jones, M.A. (2005), *Campylobacter jejuni*-induced cytokine responses in avian cells, *Infect. Immun.* 73, 2094-2100.

Multiplex-PCR und *fla*-Typisierung zum Nachweis und zur Differenzierung von *Campylobacter jejuni*- und *Campylobacter coli*-Isolaten bei Legehennen

Müller, W.* und Methner, U.

Campylobacter (C.) jejuni und *C. coli* gehören weltweit zu den bedeutendsten Erregern bakteriell bedingter Gastroenteritiden des Menschen. Als Keimreservoir gelten verschiedene Nutztiere, vor allem Geflügel, Rind und Schwein, aber auch Haustiere wie Hund und Katze sowie wild lebende Vögel.

Die phänotypische Unterscheidung der Spezies *C. jejuni* und *C. coli* beruht vorwiegend auf der Hyppurathydrolyse, die jedoch zeitaufwändig und nicht immer eindeutig ist. Wir optimierten die aus der Literatur bekannten Primer, basierend auf dem 16S rRNA-Gen für den Genus *Campylobacter* und dem *mapA*-Gen für *C. jejuni* bzw. dem *ceuE*-Gen für *C. coli*, um sie in einer Multiplex-PCR einsetzen zu können. Somit ist es möglich, in einem PCR-Ansatz das Genus und die Spezies von *Campylobacter* sicher, schnell und kostensparend zu bestimmen.

Von neun Tieren eines Legehennenbestandes mit Bodenhaltung konnten aus Leber, Milz, Duodenum, Jejunum und Zäkum insgesamt 26 *Campylobacter*-Stämme isoliert werden. Unter Anwendung der Multiplex-PCR erfolgte eine eindeutige Differenzierung in dreizehn *C.-jejuni*- und dreizehn *C.-coli*-Stämme. Dabei zeigte sich, dass einige Legehennen mit beiden Spezies infiziert waren. Dies erhob die Forderung nach einer weiteren Typisierung.

Zur molekularbiologischen Differenzierung von *C.-jejuni*- und *C.-coli*-Isolaten sind PFGE, AFLP, Ribotyping, ERIC-PCR und *fla*-Typisierung beschrieben worden. Aufgrund ihrer raschen und einfachen Durchführbarkeit testeten wir, inwieweit die *fla*-Typisierung für die weitere Differenzierung der *C.*-Isolate geeignet ist.

Die dreizehn *C.-jejuni*- und dreizehn *C.-coli*-Stämme wurden durch *flaA*- und *flaB*-RFLP analysiert. Dazu wurde in separaten PCRs mit den Primerpaaren FlaA1/FlaA2 und FlaB3/FlaB4 jeweils ein 1,7 kb-Fragment amplifiziert und nachfolgend mit den Restriktasen *DdeI* und *AluI* verdaut. Die Restriktionsanalyse erfolgte mit dem Programm GelCompar II. Im Ergebnis konnten die dreizehn *C.-jejuni*-Stämme in elf *flaA*-Subtypen und mittels *flaB*-Typisierung in acht *flaB/DdeI*- und zehn *flaB/AluI*-Subtypen unterteilt werden. Hier führte die *flaA*-Typisierung im Vergleich zur *flaB*-Typisierung zu einer stärkeren Differenzierung. Die dreizehn *C.-coli*-Isolate zeigten eine weniger ausgeprägte Diversität. Die *flaA*-Typisierung ergab sechs Subtypen, wobei acht Isolate einen Subtyp bildeten. Mit der *flaB*-Typisierung wurden fünf *flaB/DdeI*- und sechs *flaB/AluI*-Subtypen differenziert. Hier bestätigte die *flaB*-Typisierung die Differenzierung in die *flaA*-Subtypen.

Die Zuordnung der identifizierten Subtypen zu den untersuchten Tieren ergab, dass vier Legehennen mit je einem nicht zum gleichen Subtyp gehörenden *C.-jejuni*- und je einem *C.-coli*-Stamm, von denen zwei Isolate zu einem Subtyp gehörten, infiziert waren. Drei Legehennen waren mit drei unterschiedlichen *C.*-Stämmen (3 genotypisch unterschiedliche *C. jejuni*, 2 *C. jejuni* und 1 *C. coli* bzw. 1 *C. jejuni* und 2 genotypisch unterschiedliche *C. coli*) infiziert. Mit Hilfe der *fla*-Typisierung ist es möglich, Subtypen sowohl von *C.-jejuni*- als auch von *C.-coli*-Isolaten zu identifizieren und damit ihre vorhandene oder fehlende genotypische Verwandtschaft nachzuweisen. Vor dem Einsatz der *fla*-Typisierung ist die Bestimmung der Spezies *C. jejuni* oder *C. coli* erforderlich, da die *fla*-Typisierung nicht zwischen diesen Spezies unterscheiden kann.

Es wurde gezeigt, dass die Multiplex-PCR eine schnelle und sichere Identifizierung der Spezies *C. jejuni* und *C. coli* erlaubt. Mit Hilfe der *fla*-Typisierung ist eine weitere Differenzierung von *Campylobacter*-Isolaten möglich, die bei der Bearbeitung von epidemiologischen Fragestellungen zu *Campylobacter*-Infektionen, insbesondere zur Ermittlung von Eintragsquellen und zur Aufdeckung von Übertragungswegen geeignet ist.

Weitere Projekte

Transkriptionsanalyse von Virulenz-assoziierten Genen bei *Campylobacter jejuni*

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

Molekularbiologische Charakterisierung von *Campylobacter fetus*-Isolaten

Schulze, F., Müller, J., Hotzel, H.

2.5 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 *Salmonella*-Infektionen des Menschen (Zoonosen).

Ausnutzung der intestinalen Besiedelungshemmung zwischen *Salmonella*-Stämmen bei der Immunisierung des Geflügels – Möglichkeiten und Grenzen

Methner, U.*, Berndt, A. und Haase, A.

Die Immunisierung mit *Salmonella*-Lebend-oder Inaktivatimpfstoffen ist eine der wichtigsten Methoden zur Steigerung der Widerstandsfähigkeit des Geflügels gegen *Salmonella*-Infektionen. Zusätzlich zur Entwicklung einer adaptiven Immunreaktion kann durch die orale Applikation von *Salmonella*-Stämmen an Eintagsküken innerhalb weniger Stunden eine starke Schutzwirkung gegen eine Re-Infektion durch eine intestinale Besiedelungshemmung induziert werden.

Für die Ausnutzung dieses Hemmungsphänomens bei der Entwicklung von *Salmonella*-Lebendimpfstoffen sind Informationen über das Ausmaß der Hemmwirkung zwischen Salmonellen unterschiedlicher Serovaren erforderlich. Daher wurde das intestinale Hemmungsvermögen von *Salmonella*-Stämmen der epidemiologisch wichtigen Serogruppen B, C1, C2 und D sowohl gegen Stämme der gleichen Serovaren bzw. Serogruppen als auch gegen Stämme unterschiedlicher Serovaren bzw. Serogruppen in einem standardisierten *in-vivo* Küken-Modell untersucht.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die stärkste intestinale Besiedelungshemmung zwischen isogenen *Salmonella*-Stämmen auftritt. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die homologe Hemmwirkung zwischen Stämmen der gleichen Serovar, auch bei unterschiedlichem Phagentyp, effektiver ist als die heterologe Hemmwirkung zwischen Stämmen unterschiedlicher Serovaren. Das Ausmaß der Hemmwirkung zwischen Stämmen unterschiedlicher Serovaren, unabhängig davon, ob sie zu der gleichen oder zu einer anderen Serogruppe gehören, ist nicht stark genug, um einen einzelnen Stamm oder eine einzelne Serovare zu identifizieren, die eine effektive intestinale Besiedelungshemmung gegen zahlreiche andere *Salmonella*-Serovaren induzieren kann.

Da jedoch *Salmonella Enteritidis* die dominierende Serovar in der Legehennenhaltung ist, besteht ein sehr großes Potential zur Ausnutzung der intestinalen Besiedelungshemmung bei neuartigen *Salmonella-Enteritidis*-Lebendimpfstoffen und damit zur Verbesserung der Wirksamkeit von Immunisierungen gegen die epidemiologisch bedeutendste *Salmonella*-Serovar.

Weitere Projekte

Epidemiologie und molekulare Charakterisierung von *Salmonella-Paratyphi B d*-Tartrat⁺ in Geflügelmastbeständen

Reiche, R. und Methner, U.

***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.

Untersuchungen zu immunologischen Abwehrmechanismen des Geflügels bei *Salmonella*-Infektionen

Berndt, A., Pieper, J. und Methner, U.

2.6 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, dagegen gilt sie in Westeuropa als getilgt. Deutschland ist seit 1956 frei von dieser Tierseuche.

Entwicklung von serologischen Bestätigungsverfahren für den Nachweis von *Burkholderia mallei*-Infektionen

Elschner, M.*, Scholz, H. und Raßbach, A.

Im internationalen Handel werden bei Einhufern serologische Untersuchungen auf Rotz gefordert. Für die Einfuhr von Einhufern aus bestimmten Drittländern sind diese serologischen Untersuchungen mittels Komplementbindungsreaktion (KBR) durchzuführen. Durch die Teilnahme an zwei internationalen Ringversuchen zur serologischen Rotz-Diagnostik im Jahr 2005, erstmalig organisiert vom Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, konnte das NRL die Qualität der eigenen Untersuchungstätigkeit überprüfen. Die Ergebnisse der Ringversuche haben jedoch gezeigt, dass z.T. Probleme beim Erkennen von serologisch positiven und negativen Tieren in verschiedenen Laboren auftreten. Als Ergebnis der Ringversuche wurde von den Teilnehmern die Notwendigkeit der Etablierung spezifischerer serologischer Nachweismethoden formuliert und vereinbart, möglichst einheitliche Antigene für serologische Untersuchungen zu verwenden. Deshalb wurde im NRL ein Westernblot etabliert, der insbesondere 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 Immunoblot deutlich verbessert werden. Die Sensitivität und die Standardisierbarkeit dieses Verfahrens sollen jedoch noch weiter optimiert werden. Zukünftig soll außerdem ein ELISA die serologischen Untersuchungsmethoden ergänzen.

2.7 BRUCELLEN

Die Brucellose ist eine Infektionskrankheit, hervorgerufen durch Bakterien der Gattung *Brucella* (*B.*). Da der Erreger vom Rind (*B. abortus*), vom Schwein (*B. suis*), vom Schaf und von der Ziege (*B. melitensis*) und in eingeschränktem Maße auch vom Hund (*B. canis*) auf den Menschen übertragen werden kann, handelt es sich um eine Zoonose. Die Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen ist eine anzeigepflichtige Tierseuche. Hauptsymptome der Brucellose beim Tier 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.

Untersuchungen zum Auftreten von Schweinebrucellose in Wildschweinbeständen Deutschlands Melzer, F.*

Die Untersuchungen konnten im Jahr 2005 abgeschlossen werden. Dabei konnten Regionen vor allem im Osten und Nordosten Deutschlands mit hoher Seroprävalenz für *Brucella*-Antikörper identifiziert werden, während gleichzeitig die Proben aus dem südwestlichen Teil Deutschlands keine Anhaltspunkte für das Auftreten von Brucellose bei Wildschweinen in dieser Region ergaben.

Um die Gesamtsituation in Deutschland besser einschätzen zu können, sollen weitere Proben auch aus anderen Bundesgebieten untersucht werden.

Bei der Durchführung der oben genannten Studie wurde klar, dass große Schwierigkeiten bei der Abgrenzung möglicher Kreuzreaktivitäten v.a. mit *Yersinia enterocolitica* O9 auftreten. Aus diesem Grund werden aktuell verschiedene serologische Untersuchungsmethoden verglichen und eine Methode zur besseren Differenzierung von Anti-*Brucella*-Antikörpern und Anti-*Yersinia*-Antikörpern hinsichtlich ihrer praktischen Anwendbarkeit experimentell überprüft.

2.8 DURCH ZECKEN ÜBERTRAGENE KRANKHEITEN

Epidemiologie der Frühsommer-Meningoenzephalitis und weiterer durch Zecken übertragener Krankheiten

Süss, J.* und Klaus, Ch.

Ausgehend von einem dokumentierten FSME-Erkrankungsfall von 2004 in der Colbitz-Letzlinger Heide, einem bisherigen Nichtrisikogebiet in Sachsen-Anhalt, führten wir in der Umgebung des Expositionsortes 2005 eine Zeckensammlung durch. Am 1. Juni 2005 wurden 297 Exemplare von *I. ricinus* durch Flaggen gewonnen, 153 Nymphen, 72 Männchen und 72 Weibchen. Die Zecken wurden vor Ort sofort auf 4°C gekühlt, im Labor gezählt, sortiert und bei -80°C gelagert. Die Untersuchung auf FSMEV erfolgte mittels One-step- und nRT-PCR.

Die 153 Nymphenstadien hatten eine durchschnittliche Virusprävalenz von 9,3 (2,7-24,5)%, die 72 Weibchen eine Virusprävalenz von 3,3 (0,4-11,6)% und die 72 Männchen eine solche von 17,7 (5,3-43,0)%. Die Adultstadien zusammen zeigten somit eine Virusprävalenz von 10,5 (4,3-43,0)%. Da wir in früheren, umfangreichen, bereits publizierten Studien in den deutschen Risiko- und Hochrisikogebieten eine durchschnittliche Virusprävalenz von 0,1-2% gefunden hatten, niemals jedoch in irgendeinem Habitat eine solche von mehr als 5%, ist dieses Ergebnis als ungewöhnlich zu bezeichnen. Ungewöhnlich ist die sehr hohe Virusprävalenz und außerdem die hohe Prävalenz in den Männchen gegenüber den Weibchen. Aus biologischen und logischen Gründen ist dieses Verhältnis in der Regel umgekehrt.

Diese Ergebnisse werden weiter verifiziert, da sie erhebliche Auswirkungen auf den öffentlichen Gesundheitsdienst der untersuchten Region haben können.

Wir erhielten vom Landesgesundheitsamt Bayern, Oberschleißheim, und vom Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München 95 ungesogene *Ixodes ricinus*-Stadien aus Sulzbach-Rosenberg aus dem Lkr. Amberg (44 Männchen, 36 Weibchen, 15 Nymphen). Diese entstammten drei Standorten (1. Tafelberg, 2. Standort 2, 3. Langholz). Hintergrund dieser Untersuchungen waren ungewöhnlich viele und z.T. ungewöhnlich schwere Krankheitsverläufe 2005 im Landkreis Amberg, wobei die Patienten an diesen Standorten exponiert worden sind.

Vom Standort Tafelberg gelangten zwei Pools mit fünf bzw. drei Weibchen, zwei Pools mit fünf Männchen, ein Pool mit drei Männchen und einer Nymphe zur Untersuchung. Alle untersuchten Zecken waren FSME-negativ. Vom Standort 2 gelangten drei Pools mit je fünf Weibchen, ein Pool mit drei Weibchen, drei Pools mit je fünf Männchen sowie ein Männchen und je ein Pool mit fünf bzw. zwei Nymphen zur Untersuchung. Ein Männchen und ein Pool mit fünf Nymphen waren FSMEV-positiv.

Vom Standort Langholz gelangten zwei Pools mit fünf Weibchen, drei Pools mit fünf Männchen und je ein Pool mit fünf bzw. zwei Nymphen zur Untersuchung. Hier erzielten wir das erstaunliche Ergebnis, dass alle Pools positiv waren, lediglich der eine Pool mit zwei Nymphen war negativ. Dieses Ergebnis kann auch zur Erklärung der besonders hohen Morbidität 2005 im Lkr. Amberg beitragen.

Wir erhielten vom Dipartimento di Scienze Biomediche, Sez. Microbiologia, der Universität Triest (AG Prof. Marina Cinco) zehn RNA-Isolate aus *I. ricinus* zur weiteren Untersuchung auf FSMEV-Sequenzen. Alle Proben waren negativ.

2.9 BAKTERIELLE UND VIRALE MISCHINFEKTIONEN

Wechselwirkung zwischen bakteriellen und viralen Mischinfektionen der Regenbogenforelle

Kotterba, G., Köllner, B.* und Fischer, U.

(in Zusammenarbeit mit Burr, S. [Institut für Veterinär bakteriologie, Universität Bern, Schweiz] und Rebl, A. [Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei, Dummerstorf])

Forellen, die eine Infektion mit *Aeromonas salmonicida salmonicida* (A.s.s.) überleben, zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber einer nachfolgenden Infektion mit dem Virus der Viralen Haemorrhagischen Septikämie (VHSV). Um die dieser erhöhten Resistenz zugrunde liegenden Immunreaktionen zu analysieren, wurden Forellen mit einem virulenten A.s.s.-Wildtyp i.p. infiziert. Die Infektionsdosis war in Versuchen so eingestellt worden, dass ca. 50 % der infizierten Tiere die Infektion überleben. In einer

kinetischen Studie wurde die Immunreaktion klinisch gesunder, moribunder und rekonvaleszenter Forellen untersucht. Dazu wurde mittels populationspezifischer monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene von Forellenleukozyten deren Kinetik in verschiedenen lymphatischen Organen immunhistologisch und durchflusszytometrisch bestimmt. Die Expression verschiedener Ag-Rezeptoren (TCR, TLR), Ko-Rezeptoren (CD4, CD8) sowie vom Aktivierungsmarker (MHC II) und das Zytokinmuster (IL8, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α) wurde mittels quantitativer RT *real time* PCR analysiert. Diese Analysen sind noch nicht abgeschlossen.

Bisher zeigte sich eine eindeutige Korrelation zwischen der Schwere der Klinik und der Expressionshöhe vom MHC II und TLR. Bei moribunden Forellen war die Expression von TLR und MHC II deutlich niedriger als in Kontrollforellen, während bei infizierten, aber klinisch gesunden sowie bei rekonvaleszenten Forellen eine stark erhöhte Expression gegenüber Kontrollforellen gemessen wurde. Diese Reaktivität wurde auch nach Infektion mit einer apathogenen *A.s.s.*-knock-out-Mutante (Typ III – Sekretionssystem) gefunden.

Die Untersuchungen werden im Modell *A.s.s.*-Infektion mit nachfolgender VHSV-Infektion der überlebenden Forellen fortgesetzt.

3 ÜBERTRAGBARE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN

Etablierung und Anwendung von transgenen Mausmodellen zum Nachweis von TSE-Erregern

Buschmann, A.*, Gretschel, A., Weber, A. und Groschup, M.H.

Die herausragende Sensitivität der am FLI entwickelten transgenen Mäuse, die das bovine Prion-Protein überexprimieren (Tgbov XV), wurde in den vergangenen Jahren nachgewiesen. Damit stellen diese Mäuse ein ideales Testsystem für den Nachweis geringer BSE-Erregermengen dar. Diese Mäuse sollen weiterhin im Rahmen der am FLI durchgeführten BSE-Pathogenese-Studie bei Rindern zur Untersuchung verschiedenster peripherer Organe BSE-infizierter Rinder eingesetzt werden. Tgbov XV Mäuse wurden am FLI bereits mit Organhomogenaten eines klinischen BSE-Falls, der 2001 an der BFAV Tübingen seziiert wurde, infiziert. Diese Untersuchungen zeigten, dass sich der Erreger beim Rind nahezu ausschließlich über das zentrale und periphere Nervensystem verbreitet, während das lymphatische System bei dieser Tierart keine Rolle zu spielen scheint.

Auch die Inkubationszeiten nach Infektion mit Schaf-Scrapie-Isolaten (verschiedener PrP-Allele) waren in den bovinisierten transgenen Mäusen nur unwesentlich länger als die für die BSE-Isolate, jedoch deutlich kürzer als in konventionellen Mauslinien. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass bei diesen Mäusen auch die Speziesbarriere Schaf/Maus partiell überwunden ist. Damit sind diese transgenen Mäuse auch zum Nachweis von Infektiosität in verschiedenen Scrapie-Isolaten geeignet.

Transgene Mäuse, die das Prion-Protein (PrP^{PARQ/ARQ}) des Schafes überexprimieren und damit ein geeignetes System zum Nachweis des Scrapie-Erregers darstellen, wurden im Zusammenhang mit einem von der Europäischen Union geförderten Forschungsprojekt am FLI hergestellt. Für das Prion-Protein des Schafes sind verschiedene die Scrapie-Empfänglichkeit beeinflussende Polymorphismen an den Positionen 136, 154 und 171 bekannt. Das PrP^{V^{RQ}}-Allel (wobei V für die Position 136, R für 154 und Q für 171 steht) geht einher mit der höchsten Empfänglichkeit, gefolgt vom PrP^{PARQ}-Allel. Dagegen scheint das PrP^{PARR}-Allel eine sehr geringe Empfänglichkeit bis hin zur Resistenz gegenüber klassischer Scrapie und BSE zu vermitteln. Dies trifft jedoch nicht in demselben Maß für atypische Scrapie zu.

Aus Übertragungsstudien mit verschiedenen Scrapie- und BSE-Isolaten ging hervor, dass Schaf-PrP-transgene Mäuse (authentisches PrP und chimäres PrP) für diese Erreger ebenfalls hochempfindlich sind. Die gemäß der EU-Verordnung 999/2001 durchgeführten Übertragungsversuche zur Stammdifferenzierung der deutschen Scrapie-Isolate werden am FLI parallel in RIII-, C57B1- und VM95-Mäusen (klassisches ‚strain-typing‘ nach etablierten Methoden) und auch in Tgshp-Mäusen durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden diese Schaf-PrP-transgenen Mäuse mit weiteren 18 Isolaten infiziert und die gegenüber konventionellen Mauslinien deutlich verkürzte Inkubationszeit bestätigte sich auch in diesen Fällen. Diese Ergebnisse unterstreichen die hohe Empfänglichkeit der transgenen Mäuse für den Scrapie-Erreger. Nach Infektion dieser Tgshp-Mäuse mit Hirnhomogenaten norwegischer und deutscher atypischer Scrapiefälle konnte deren prinzipielle Übertragbarkeit bestätigt werden. Weitere Analysen zur Stammdifferenzierung dieser Isolate stehen nun an.

In Übertragungsstudien konnte die überragende Empfindlichkeit der bovines PrP^C überexprimierenden transgenen Mäuse (Tgbov XV) zum Nachweis von BSE-Erregern aus dem Rind gezeigt werden. Obwohl sich inzwischen gezeigt hat, dass so genannte dissoziierte BSE-Fälle, d.h. Fälle, die in BSE-Schnelltests und in der Abklärungsdiagnostik abweichende Ergebnisse zeigen, selten vorkommen, eignen sich diese Mäuse auch hierbei zur Abklärung der Diagnose. Ausgewählte deutsche BSE-Fälle wurden daher zu Übertragungsstudien in Tgbov XV Mäuse inokuliert. Die dabei bisher festgestellten Übertragungscharakteristika entsprachen denen aus früheren BSE-Übertragungsexperimenten in diesen Mäusen.

Ferner wurde in einer Zeitstudie das Auftreten von PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn und Rückenmark BSE-infizierter TgbovXV-Mäuse auf verschiedenen genetischen Hintergründen verfolgt. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass der Erreger nach intrazerebraler Inokulation zuerst im Gehirn und etwa um 50 Tage verzögert auch im Rückenmark nachweisbar wird. Die gleichzeitige Expression des murinen Prion-Proteins bewirkte eine Verlängerung der Inkubationszeit um ca. 100 Tage.

Nachweis und Bestimmung der Überlebensfähigkeit von BSE-Erregern in Nahrungsmitteln und in der Umwelt (LMU-Forprion)

Groschup, M.H.*, Buschmann, A., Weber, A. und Ziegler, U.

Dieses in Zusammenarbeit mit der Ludwig-Maximilians-Universität München, der TU München und der Bundesanstalt für Fleischforschung (BAFF) durchgeführte Projekt befasst sich mit der Frage eines möglichen mikrobiellen Abbaus von BSE-Erregern in Nahrungsmitteln und im Gastrointestinaltrakt von Rindern. Hierzu wurden an der BAFF und an der TU München über 700 verschiedene Bakterienstämme und/oder deren Kulturüberstände auf eine mögliche proteolytische Aktivität getestet und positive Stämme danach auf eine mögliche Degradation des pathologischen Prion-Proteins (PrP^{Sc}) hin untersucht. Als erste immunochemische Readout-Verfahren wurden ein Sandwich-ELISA und/oder ein Immunoblot verwendet. Verschiedene Bakterienarten zerstörten PrP^{Sc}, so dass es mittels der verwendeten immunochemischen Verfahren nicht mehr detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse sollen nun durch Bioassays (konventionelle und/oder transgene Tiere) verifiziert werden.

Evaluierung therapeutischer Proteine: Vermehrung und Titration von Scrapie-Erregern aus Mäusen und Hamstern, Herstellungsverfahren therapeutischer Proteine (Aventis)

Weber, A.*, Buschmann, A. und Groschup, M.H.

Dieses Projekt befasst sich mit der Evaluierung der TSE-Abreicherungskinetik für Herstellungsverfahren von therapeutischen Proteinen aus humanem Plasma. Die Qualität und Sicherheit dieser Produkte wird durch Spender- und Spendenauswahl, ein validiertes Herstellungsverfahren mit Validierung der Virusabreicherung, die Qualitätskontrolle und Freigabe der Präparate nach Einhaltung der Spezifikation sowie durch die Freigabe durch die nationale Zulassungsbehörde (PEI Langen) gewährleistet. Für die Überprüfung der Produktionsprozesse hinsichtlich ihrer TSE-Abreicherungs- und Inaktivierungskapazitäten 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 Prionen wurden dem Eingangsmaterial, z.B. Plasma, zugesetzt und anschließend wurde der Produktionsschritt mit diesem Material durchgeführt. Die Erregerkonzentration wurde im Eingangsmaterial, in den Zwischenprodukten und im Ausgangsmaterial eines jeden Schrittes mittels Immunoassays und hochempfindlicher Infektiositätsassays ermittelt. Dadurch kann dann qualitativ und quantitativ bestimmt werden, ob während der üblicherweise verwendeten Aufreinigungsverfahren potentiell im Eingangsmaterial vorhandene Prionen entfernt werden oder ob es im Gegenteil gar zu einer Anreicherung in bestimmten Fraktionen kommen kann.

Untersuchung der molekularen Mechanismen bei Erregervermehrung in der Zellkultur und in zellfreien Systemen

Eiden, M.*, Kupfer, L., Proft, J. und Groschup, M.H.

Prion-Erkrankungen oder transmissible spongiforme Enzephalopathien sind charakterisiert durch eine strukturelle Veränderung (Konversion) des zellulären Prion-Proteins PrP^C in eine pathogene Isoform

PrP^{Sc}. Im Vergleich zu PrP^C zeichnet sich PrP^{Sc} vor allem durch eine partielle Resistenz gegenüber Proteinase K aus, zusätzlich ist eine Aggregation der PrP^{Sc}-Moleküle und Ausbildung von Fibrillen zu beobachten.

Um diese Konversion genauer zu analysieren, wurde ein Assay etabliert, bei dem PrP^C-Moleküle zusammen mit aufgereinigten PrP^{Sc}-Aggregaten (seeds) in einem geeigneten Probenpuffer inkubiert werden. Unter diesen Bedingungen kann allein PrP^{Sc} die Konversion von rekombinantem PrP^C in die partiell Proteinase K (PK)-resistente Isoform PrP^{res} induzieren. Die Detektion des PrP^{res} erfolgt dabei mit spezifischen Antikörpern, die nur das neu konvertierte PrP^{res} erkennen. Rekombinantes murines PrP^C stammt dabei aus *E. coli* und hochaufgereinigtes PrP^{Sc} aus Maus-passagierten Scrapie- oder BSE-Isolaten/Stämmen.

Mittels dieses zellfreien Assays konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Prion-Erreger ihre spezifische Konformation auch auf das neu konvertierte PrP^{res} übertragen. Dies konnte durch das unterschiedliche Molekulargewicht der PK-resistenten PrP^{res}-Fragmente nachgewiesen werden: wie bei der unglykosylierten Bande des PrP^{Sc} seeds war das BSE-generierte neugebildete analoge Fragment im Westernblot etwa 1 kDa kleiner als das entsprechende Scrapie-Fragment.

Auch einzelne Aminosäuren können die Konversion stark beeinflussen. Für diese Untersuchungen wurden sowohl ovine und bovine als auch chimäre Konstrukte (Maus-Rind bzw. Maus-Schaf) verwendet. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass allein der Austausch einer einzelnen Aminosäure großen Einfluss auf die Konvertierbarkeit aufweist und dies in Übereinstimmung mit den *In-vivo*-Befunden liegt. Des Weiteren zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz einen Einfluss auf die Präferenz mutanter Konstrukte zu verschiedenen TSE-Erregern haben kann. Auch die Beteiligung größerer Molekülbereiche innerhalb des PrP^C an der Konversion soll näher analysiert werden. Dazu wurden N-terminal verkürzte Konstrukte rekombinant hergestellt und im zellfreien Konversionsassay getestet.

Strategien zur Verhütung und Therapie von Prion-Krankheiten (Europrion)

Eiden, M.*, Kupfer, L. und Groschup, M.H.

Es wurde ein zellfreier Konversionsassay (s.o.) verwendet, um die Konversion rekombinanten PrP^Cs durch mauspassagierte Scrapiestämme (Me7, 87V, 22A, RML) und eines mauspassagierten BSE-Stammes zu charakterisieren. Mit Ausnahme des RML-Stammes konnten alle Stämme das Prion-Protein in eine PK-resistente Form PrP^{res} konvertieren. Die Konversionsrate lag dabei bei 1-2 %. Die Konversionskinetik konnte in drei Phasen getrennt werden: zuerst ein langsamer Anstieg innerhalb der ersten 48 Stunden, dann ein starker Anstieg zwischen 48-72 Stunden und danach eine *steady state* Phase zwischen 72-168 Stunden.

Mittels dieses Ansatzes wurde auch das Phänomen untersucht, dass Schafe mit dem Genotyp PrP^{PARR} bzw. PrP^{AHQ} im Gegensatz zu PrP^{PARQ} Schafen nur schwach bzw. gar nicht empfänglich gegenüber klassischen Scrapie-Erkrankungen sind. Dazu wurden bakteriell exprimierte Varianten dieser drei Genotypen hergestellt und im zellfreien Konversionsansatz zusammen mit mauspassagierten Scrapie-Stämmen inkubiert. Nur mit der PrP^{PARQ}-Variante konnte eine Konversion nachgewiesen werden.

Schließlich wurden 32 Varianten des bakteriellen murinen Prion-Proteins hergestellt, die eine zusätzliche Heptapeptide (Kemptide-)Sequenz an verschiedenen Positionen innerhalb des Prion-Proteins besitzen. Die Ergebnisse aus der zellfreien Konversion zeigen, dass Insertionen im N- (Position 39-94) bzw. C-Terminus (Position 226-232) des PrP^Cs keinen großen Einfluss auf die Position besitzen. Insertionen innerhalb der zentralen Core-Region des Proteins inhibierten jedoch die Konversion. Diese Ergebnisse stimmten mit den Daten aus Zellkultur-Experimenten überein und zeigen die Bedeutung der Core-Region für den Konversionsprozess.

Studien zur Blockade von Prion-Infektionen in der Zellkultur und im Tiermodell (BMBF-Therapie)

Geissen, M.*, Oelschlegel, A. und Groschup, M.H.

Alle übertragbaren spongiformen Enzephalopathien (Prion-Erkrankungen) gehen mit der Strukturänderung des zellulären Prion-Proteins einher. Für die Untersuchung dieser Konversionsreaktion des PrP^C zu PrP^{res} eignet sich in besonderem Maße die Zellkultur, da in ihr die Schnelligkeit eines durch kurze Generationszyklen charakterisierten Systems mit den Vorteilen eines *In-vivo*-Modells kombiniert werden.

Die Zellkultur bietet somit die Grundlage, potentiell therapeutisch wirksame Substanzen in einem relativ engen Zeitraum unter weitgehend physiologischen Bedingungen zu prüfen. Ausgangspunkt zur Bearbeitung dieser Fragestellung war die Adaption von mehreren mit Scrapie infizierten Zelllinien (ScN_{2a}, N_{2a}-Zellen mit RML infiziert; SMB, „Scrapie Mouse Brain“ mit 22F bzw. RML infiziert) auf das 96 well-Plattenformat und die Etablierung eines sensitiven Detektionssystems. Es wurden so die Voraussetzungen geschaffen, Bibliotheken chemischer Substanzen auf mögliche Hemmstoffe der PrP-Aggregation zu untersuchen.

Im Berichtsjahr (2005) wurden 10.000 chemische Verbindungen aus einer Substanzlibrary (DIVERSet-1-Bibliothek (ChemBridge)) in Zellkultur untersucht und der Screen weiterer 10.000 Substanzen (DIVERSet-2 (ChemBridge)) begonnen. Im Primärscreen der DIVERSet-1-Bibliothek wurden 530 chemische Substanzen identifiziert, die eine Hemmwirkung auf die Konversion von PrP^C zu PrP^{res} ausüben. Mittels Verdünnungsreihen wurden die wirksamsten Substanzen ermittelt, wobei 62 Substanzen identifiziert werden konnten, die bei einer Konzentration von 1 µM die Aggregation von PrP^C zu PrP^{res} hemmten. In weiteren Untersuchungen wurde die Wirksamkeit der Substanzen bei niedrigerer Dosis, die Toxizität und die Hemmwirkung bei Applikation auf weiteren Zelllinien erforscht. Sechzehn der getesteten Substanzen eignen sich aufgrund der Ergebnisse der *In-vitro*-Studien für eine weitere Evaluierung im Mausbioassay. Die chemische Struktur aller Substanzen mit konversionshemmenden Eigenschaften wurde in Abhängigkeit von ihrer Wirkung im Computermodell analysiert und auf ähnliche Strukturmerkmale hin untersucht. Dabei wurden mehrere Struktur motive identifiziert, die nun die Grundlage für die gezielte Synthese potentieller Wirkstoffe bilden. Die Ergebnisse der Zellkulturstudien waren Grundlage für die Genehmigung einer Tierversuchsstudie, in der die Wirksamkeit der Substanzen im Mausbioassay überprüft werden wird.

TSE-Forschungsplattform: Ausbau der nationalen BSE-Probenbank

Ziegler, U.* und Groschup, M.H.

Die nationale BSE-Probenbank gewährleistet, dass von jedem deutschen BSE-Fall entsprechendes Probenmaterial gesammelt wird und durch die verstärkte Nutzung der Proben aus der BSE-Pathogenese studie eine breite BSE-Probenpalette, die nach standardisierten Methoden asserviert wurde, zur Verfügung steht.

Die BSE-Gewebebank umfasst neben verschiedenen Gewebeproben aller in Deutschland bis dato 389 BSE-positiv getesteten Tiere (Stand 01.01.06) auch Proben von ca. 16.000 Kohortentieren zu ausgewählten Fällen. Des weiteren sind BSE-Standardhirnhomogenate sowie definierte Negativproben und BSE-differentialdiagnostisch relevante Proben im Archiv vorrätig. In der Probenbank sind derzeit von zehn klinisch BSE-positiven Rindern aus dem Feld verschiedene Körperflüssigkeiten vorhanden (wie z.B. Vollblut, Plasma, Serum, Liquor und Harn) sowie eine breitere Palette an gefrorenen bzw. formalinfixierten Organ- und Gewebeproben dieser Tiere. Es war leider in den letzten zwei Jahren nicht möglich, trotz umfangreicher Bemühungen von Seiten des FLI und der Landesbehörden, bei BSE-Verdachtsfällen über die normalerweise zur Durchführung der diagnostischen Abklärungsuntersuchungen einzusendenden Proben eine breitere Probenpalette, besonders Körperflüssigkeiten, zu erhalten. Die Dokumentation der Probenbank sowie der wissenschaftliche Austausch der Proben erfolgt nach der GLP-Richtlinie.

Im Rahmen der BSE-Pathogenese studie (Start 18.12.2002) konnte mittlerweile ein sehr umfangreiches Teilarchiv mit mehr als 146.000 Einzelproben (Stand: 31.12.2005) von den infizierten Rindern und zugehörigen Kontrolltieren asserviert werden. Das Probenspektrum umfasst neben den verschiedensten Arten an Körperflüssigkeiten (Blut, Serum, Plasma, Liquor, Speichel, Harn) auch eine Vielzahl von Organ- und Gewebeproben (ca. 150 verschiedene Organ- und Gewebearten), die im Rahmen der Sektionen einzelner Tiere generiert werden. Alle diese Materialien sind in einer computergestützten Datenbank unter Verwendung eines Etiketten-Barcodesystems registriert.

Im Rahmen der nationalen TSE-Forschungsplattform wurde dieses Material auf Antrag deutschen und europäischen Wissenschaftlern, die über Prion-Infektionen arbeiten, zur Verfügung gestellt. Nach Anfrage bei der TSE-Geschäftsstelle und auf der Basis wissenschaftlicher Kriterien wurden im Jahr 2005 von der Probenbank 1.950 Einzelproben an dreizehn verschiedene TSE-Arbeitsgruppen (Antragsteller) versandt.

TSE-Forschungsplattform: Durchführung einer BSE-Pathogenesestudie bei Rindern

Groschup, M.H.*, Ziegler, U., Weber, A., Hammerschmidt, B., Hoffmann, C. und Buschmann, A.

Seit nunmehr drei Jahren läuft am INNT ein Tierversuch zur Erforschung der BSE-Pathogenese beim Rind (Start: 18.12.2002). Ziel der BSE-Pathogenesestudie ist es, den Verlauf der BSE-Infektion von der Erregeraufnahme bis zum Ausbruch der Krankheit zu erforschen und vorrangig Proben von mit BSE infizierten, aber noch nicht klinisch erkrankten Tieren zu gewinnen. Die Studie dient der Aufklärung der Erregerausbreitung im infizierten Tier, insbesondere des Wegs vom Magen-Darm-Trakt bis zum Gehirn. Sie ist zudem eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung und Bewertung von BSE-Tests, darunter Lebendtests.

Im Rahmen der Studie wurden 56 Kälber oral mit je 100 g eines BSE-Gehirn-Mazerates infiziert. Weitere 18 Rinder dienen als nicht infizierte Kontrolltiere. Am lebenden Tier werden Blut- und Harnproben (alle acht Wochen) sowie Rückenmarkflüssigkeit (alle vier Monate, unter Sedierung) entnommen. Nach einem definierten Sektionsplan werden alle vier Monate Tiere euthanasiert und bei der anschließenden Sektion werden über 1.400 Einzelproben aus mehr als 150 Organen und Geweben wie etwa Gehirn, Rückenmark, Speicheldrüse, Mandel, Netzhaut, Leber, Milz, Niere, Darm und Knochen sowie verschiedenste Körperflüssigkeiten entnommen und asserviert. Bis dato wurden bereits 34 infizierte Rinder und elf Kontrolltiere sezziert (Stand: 12.01.2006). Die Probenentnahme erfolgt unter TSE-sterilen Bedingungen, d.h. es wird eine Kontamination von Proben durch Verschleppung des Erregers von einer zuvor entnommenen Probe durch die Verwendung individueller Instrumenten-Sets verhindert. Der immunhistochemische Nachweis von PrP^{Sc}-Ablagerungen in den Peyerschen Platten des distalen Ileums gelang bisher bei Tieren ab zwölf Monaten p.i. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die orale BSE-Infektion bei den Tieren angegangen ist. Es wurde begonnen, ausgewählte Proben, die auf diese Weise gewonnen wurden, in Übertragungsstudien in transgenen Mäusen einzusetzen, die das Rinder-PrP exprimieren. Aus vorangegangenen Experimenten ist bekannt, dass diese Mäuse mehr als 10.000 mal empfindlicher für eine BSE-Infektion sind als konventionelle Mäuse. Mit Hilfe dieser Maus-Bioassays soll versucht werden, den Weg des Erregers zum zentralen Nervensystem zu ergründen, und die Ergebnisse der Pathogenesestudie sollten darüber hinaus detaillierter auf das Expositionsrisiko für den Menschen beim Verzehr von Rindfleisch schließen lassen.

Ein verlässlicher Test am lebenden Tier steht bislang nicht zur Verfügung, allerdings kann eine gründliche klinische Untersuchung bereits Hinweise auf eine BSE-Erkrankung geben. Um bereits erste klinische Anzeichen einer beginnenden BSE-Erkrankung bei den experimentell infizierten Rindern sicher feststellen zu können, werden alle Tiere alle acht Wochen nach einem festgelegten Untersuchungsschema beurteilt im Hinblick auf ihr Verhalten, ihre Sensibilität (Prüfung der Überempfindlichkeit auf Berührung, Manipulation an Kopf und Hals, Reaktion auf Lärm und Licht, Besenprobe) und ihre Bewegung (Lahmheit/Ataxie). Bei der letzten klinischen Einzeltierbeurteilung im November 2005 – 34 Monate nach Infektion der ersten Rinder – zeigten erste Rinder Verhaltens- und Sensibilitätsauffälligkeiten, ohne dass bisher von einer typischen BSE-Klinik gesprochen werden kann.

Untersuchungen zur Pathogenese der BSE-Infektion bei Schafen (BSE in sheep)

Hoffmann, C.*, Weber, A., Hammerschmidt, B. und Groschup, M.H.

Mittels experimenteller BSE/Scrapie-Co-Infektionen bei Schafen und Mäusen sollen im Rahmen einer transnationalen Kooperation von acht Partnern in sieben EU-Ländern wichtige Fragen der Krankheitsentstehung und Erregerverbreitung geklärt werden. Von Interesse ist dabei, ob sich der BSE-Erreger in einer solchen Mischinfektion gegenüber dem Scrapie-Erreger durchsetzen kann.

Hierzu wurden im INNT ovine PrP^C-überexprimierende transgene Mäuse mit dem BSE- und dem Scrapie-Erreger infiziert. Die unterschiedlichen Tiergruppen erhalten jeweils ein Gehirnhomogenat, das aus einem von drei verschiedenen europäischen Partner zur Verfügung gestellten definierten Scrapie-Isolat und einem ovinen BSE-Isolat besteht. Die Co-Infektion erfolgte dabei zunächst simultan mittels eines Gemisches aus beiden Isolaten. Zudem wurden, in einem zweiten Versuchsansatz, aufeinanderfolgende Inokulationen mit einem zeitlichen Abstand von vier Wochen durchgeführt.

Zeitgleich werden entsprechende BSE/Scrapie-Co-Infektionen 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 einer präklinischen Diagnostik über den PrP^{Sc}.

Nachweis. Nach Auftreten klinischer Symptome werden die Schafe euthanasiert und seziiert, wobei ebenfalls Proben des lymphatischen Gewebes und ausgewählte nervale Strukturen des Kopfes entnommen werden.

Anhand der im Maus-Bioassay gewonnenen und der von den französischen Kollegen zur Verfügung gestellten Proben erfolgt der Nachweis und die Charakterisierung des zugrunde liegenden Erregerstammes mit histopathologischen, immunhistologischen und biochemischen Methoden. Dabei soll insbesondere bestimmt werden, ob eine BSE- oder Scrapie-Infektion vorliegt.

Studien zur Pathogenese bei Schafen nach alimentärer Infektion mit BSE- und Scrapie-Erregern (Sc-Gut)

Hoffmann, C.*, Hammerschmidt, B., Weber, A. und Groschup, M.H.

In diesem von der EU geförderten Gemeinschaftsprojekt werden die initialen Vorgänge bei der Aufnahme von Scrapie-Erregern im Darm und im Darm-assoziierten 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 Prion-Proteins im Darm sowie im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe erfolgte dabei mit Hilfe immunhistologischer Techniken. Da jedoch in der Immunhistologie eine Unterscheidung zwischen pathologischem und zellulärem Prion-Protein nicht möglich ist und daher eine Akkumulation von zellulärem PrP im Darm und in den Mesenteriallymphknoten nicht ausgeschlossen werden kann, muss die Infektiosität dieses Gewebes mittels eines Maus-Bioassays überprüft werden. Zu diesem Zweck stehen am INNT ovine PrP überexprimierende transgene Mäuse zur Verfügung, deren Empfänglichkeit für Scrapie nachgewiesen und deren PrP-Expression in nicht-neuronalen Geweben charakterisiert ist. Titrationsexperimente zeigen zudem, dass diese transgenen Mäuse empfindlicher für Scrapie-Erreger sind als konventionelle RIII-Mäuse. Zur Verifizierung der immunhistologisch beobachteten Erregervermehrung sind, in Absprache mit den Kooperationspartnern, ausgewählte Proben des oben beschriebenen Infektionsversuches in eine definierte Anzahl Mäuse inokuliert worden. Das Auftreten der ersten klinischen Symptome und der damit einhergehende Nachweis der Infektiosität werden zum Beginn des Jahres 2006 erwartet.

In einer zweiten Studie soll die Akkumulation von PrP^{Sc} im peripheren lymphatischen Gewebe, insbesondere innerhalb der Lymphfollikel, nach oraler Infektion untersucht werden. Hierzu sind eine definierte Anzahl von Wildtyp-Mäusen mit Scrapie-positivem Schaf-Gehirnhomogenat oral infiziert worden. Ein Teil dieser Mäuse wird zu einem definierten subklinischen Zeitpunkt, ein zweiter Teil nach Eintreten der klinischen Symptome untersucht. Mittels neu zu etablierender immunhistologischer Methoden werden die Veränderungen bezüglich Verteilung und Morphologie der Leukozyten (T-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen) innerhalb verschiedener Darm-assoziiierter und peripherer Körper-Lymphknoten untersucht. Proliferative und apoptotische Vorgänge innerhalb der Keimzentren werden dabei besonders berücksichtigt. Der Versuchsaufbau entspricht im Detail einem von den norwegischen Kooperationspartnern durchgeführten Experiment am Schaf und ermöglicht somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse über Speziesgrenzen hinweg.

Gewinnung von biologischen Ressourcen zur Identifizierung von Surrogat-Markern bei BSE (DEFRA Blood Separation)

Brenn, A.* und Groschup, M.H.

(in Zusammenarbeit mit Borthwick, E.B. und Williams, J.L., Department of Genetics and Genomics, Roslin Institute, Roslin, Midlothian, Schottland)

Obwohl das Immunsystem nicht an der Bekämpfung einer TSE-Infektion beteiligt ist, sind Zellen des Immunsystems in den Infektionsprozess eingebunden. Transkriptionsstudien unter Zuhilfenahme von DNA-Microarrays können Veränderungen im Genexpressionsmuster dieser Zellen nachweisen und somit frühe Hinweise auf eine BSE-Infektion in lebenden Tieren liefern. Im Rahmen der Untersuchungen wurden Immunzellen aus Blutproben der Kontroll- und BSE-infizierten Rinder aus der BSE-Pathogenesestudie mittels Erythrolyse gewonnen und durch magnetische Zellsortierung (MACS) mit Hilfe

spezifischer Antikörper CD21-positive B-Zellen, WC1-positive T-Zellen, CD4-positive T-Zellen und CD14-positive Monozyten angereichert. Die aus diesen Zellpopulationen gewonnene RNA ist die Grundlage für Analysen mit Arrays, die 15K ESTs aus einer Gehirn- und Makrophagen-cDNA-Bibliothek tragen, die unter maßgeblicher Beteiligung des Roslin Institutes durchgeführt werden. Die Bestätigung viel versprechender Resultate erfolgt jeweils mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) an geeigneten Proben. Regelmäßige Arbeitstreffen zwischen den Projektpartnern und gegenseitige Arbeitsbesuche dienen zur Diskussion des aktuellen Standes des Projektes und zur Vorbereitung eines Austauschaufenthaltes am Roslin Institute. Hauptaufgaben während dieses einwöchigen Aufenthaltes im September waren die Qualitäts- und Quantitätskontrolle der in Greifswald isolierten RNA-Proben, DNA-Microarray-Experimente und die Bestätigung erster Resultate mittels quantitativer RT-PCR (RT-qPCR).

Enzymatische Abreicherung zur Herstellung von BSE-Prionen-freien tierischen Produkten (CIDC)

Groschup, M.H.*, Weber, A., Buschmann, A. und Ziegler, U.

Im Rahmen dieses in Kooperation mit dem Central Institute for Animal Disease Control (CIDC-LELYSTAD) durchgeführten Projektes wurde untersucht, inwieweit hochaktive proteolytische Enzyme geeignet sind, BSE-Prion-PrP^{Sc} und BSE-Infektiosität zu inaktivieren und damit zur Herstellung von erregerefreien tierischen Produkten geeignet sind. Als Musterenzym diente hierbei ‚Keratinase‘, welche rekombinant hergestellt wurde und bereits in Vorversuchen eine gewisse dekontaminierende Aktivität gezeigt hat (Langeveld et al. 2003). Hierbei wird BSE-Gewebe-Homogenat zunächst auf 115° C erhitzt und anschließend mit Keratinase behandelt. Zur Messung der Anfangsinfektiosität und der nach der Behandlung verbliebenen Restinfektiosität werden die Proben in Rinder-PrP^C-überexprimierende transgene Mäuse inokuliert. Ein Teil dieser laufenden Versuche wird in enger Kooperation mit der Greifswalder Biotechnikfirma Mikromun GmbH durchgeführt.

‚Network of Excellence‘ NeuroPrion

Groschup, M.H.* und Mitarbeiter

Im September 2003 wurde ein europäisches „Exzellenznetzwerk“ im Bereich der Prion-Forschung ins Leben gerufen, das von der Europäischen Kommission finanziell unterstützt wird. Die Koordination der Forschung an Prion-Krankheiten auf europäischer Ebene hat in den letzten Jahren im BSE-Krisenmanagement eine große Rolle gespielt. Da wir aber die Biologie der Prionen immer noch nicht vollständig verstehen, besteht auch noch heute eine große Unsicherheit in der Gesellschaft. Daher ist Koordination das Schlüsselement, um die Gesundheit von Mensch und Tier sicher zu stellen und zukünftige BSE-Krisen zu verhindern. NeuroPrion ist ein Konsortium aus 52 führenden Forschungsinstitutionen in Europa, die sich verpflichtet haben, zusammenzuarbeiten und eine starke europäische Forschung auf dem Gebiet der Prion-Krankheiten zu etablieren. Dieses Exzellenznetzwerk bringt mehr als 90 % der führenden Laboratorien in Europa, die sich mit Prion-Krankheiten befassen, zusammen.

Die primären Ziele von NeuroPrion sind die Strukturierung und Integrierung der Leistungen der wichtigsten Prion-Forscherteams, um die Fragmentierung der Forschung zu reduzieren und eine beständige Leistung zu etablieren, die die menschliche Gesundheit bewahrt und fördert. NeuroPrion hat ein gemeinsames Programm eingeführt, welches sich auf die folgenden Forschungspfeiler stützt: Prävention (Dekontamination, Diagnose, Unterscheidung von Stämmen), Behandlung (Entwicklung neuer Medikamente, Definition neuer therapeutischer Ziele), Kontrolle (Überwachung von Mensch und Tier, menschliche und tierische Gewebebanken) und Risiko (Risikofaktoren, -bewertung, -management). Das INNT nimmt an all diesen Arbeiten aktiv teil und erhält dafür finanzielle Unterstützung.

Übertragung von atypischen (unclassified) Scrapie-Fällen auf konventionelle und transgene Mäuse (Defra atypicals)

Buschmann, A.*, Weber, A. und Groschup, M.H.

Nachdem in Norwegen, Deutschland und Frankreich atypische Scrapie-Fälle aufgetreten waren, die sich immunochemisch-diagnostisch (abweichendes PrP^{Sc}-Bandenmuster mit niedrigerer PK-Resistenz), neuro-

pathologisch und in der Art des Vorkommens (zumeist Einzeltierkrankungen bei bis dato als Scrapie-resistent geltenden Schaf-Genotypen) unterscheiden, galt es zunächst, deren Übertragbarkeit (d.h. infektiöse Genese *versus* Proteinopathie) zu verifizieren. Hierzu standen im INNT Schaf-Pr^{PC} überexprimierende transgene Mäuse als Speziesbarriere-freies Mausmodell zur Verfügung. Nachdem zunächst die aus Deutschland stammenden atypischen Scrapie-Fälle inokuliert waren, wurden auf Anfrage des britischen Verbraucherschutzministeriums auch britische so genannte ‚unclassified‘ Scrapie-Fälle auf inhärente Infektiosität untersucht. Während die Inokulation der deutschen Fälle bei einem Teil der transgenen Mäuse bereits zu Scrapie-ähnlichen Erkrankungen führte, befinden sich die mit den britischen Proben inokulierten Mäuse erst wenige Tage post inoculationem.

Effekt der Leukodepletion auf die Übertragung von BSE-Erregern bei Schafen (DOH-IAH)

Groschup, M.H.*, Weber, A., Buschmann, A. und Ziegler, U.

Im Rahmen dieses Projektes „The effect of leucodepletion on transmission of BSE by transfusion of sheep blood components“ wird das Vorhandensein von BSE-Erregern im Blut infizierter Schafe untersucht. Hierzu werden zwei Teilprojekte bearbeitet. Im ersten Teilprojekt werden Schafe experimentell mit BSE infiziert (unter Federführung des Institute for Animal Health, Compton, Vereinigtes Königreich) und Gesamtblut und Blutfraktionen (Plasma, Blutplättchen, Erythrozyten u.a.) gesammelt. Die Blutentnahmen sollen zu verschiedenen Zeitpunkten in der Inkubationszeit geschehen. Im zweiten Teilprojekt (welches unter Federführung des INNT durchgeführt wird) sollen diese Proben dann in Maus-Bioassays auf BSE-Infektiosität untersucht werden. Hierbei sollen die am INNT entwickelten Schaf-Pr^{PC}-überexprimierenden Mäuse verwendet werden. Ein Teil der Versuche am FLI wird in enger Kooperation mit der Greifswalder Biotechnikfirma Mikromun GmbH durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien können auch im Hinblick auf das Übertragungsrisiko von vCJD im Rahmen von Bluttransfusionen von Bedeutung sein.

Pr^{PSc}-induzierte Änderungen zellulärer Genexpression

Nebrich, S., Schöffler, P., Stitz, L. und Rziha, H.-J.*

Peripherer Kontakt mit pathologischem Prion-Protein (Pr^{PSc}) führt nach längerer Inkubationszeit zu einer neurodegenerativen Erkrankung, der transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE), die mit der Akkumulierung von Pr^{PSc} im ZNS korreliert und nach Aktivierung von Astrozyten/Mikroglia und Vakuolenbildung letztlich zum Verlust neuraler Zellen führt. In diesem Projekt werden, um Veränderungen zellulärer Faktoren im Verlauf einer TSE-Erkrankung, insbesondere während des präklinischen Stadiums im Pr^{PSc}-Mausmodell untersucht. Die Wildtypstämme CD-1 und C57/B16 sowie der transgene, Pr^{PC} überexprimierende Mausstamm tga20 wurden mit Pr^{PSc} (RML) intracranial (ic), intraperitoneal (ip) oder oral infiziert und zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion bis zum terminalen Krankheitsstadium getötet. Die verschiedenen Mausstämme zeigten je nach Inokulationsweg klare Unterschiede in Auftreten und Art der klinischen Symptome sowie der Vakuolisierung und Gliose im Gehirn. Insbesondere tga20 Mäuse hatten nach i.c. und i.p. Infektion erst im terminalen Krankheitsstadium im Gehirn spongiforme Veränderungen sowie Astrozytose (GFAP-Nachweis) und Mikrogliose. Dagegen weisen i.c. oder i.p. infizierte Wildtyp-Mäuse schon zu einem frühen, präklinischen Stadium deutliche spongiforme Veränderung und Astrozytose im Gehirn auf, ohne Anzeichen einer klinischen Erkrankung. Inwieweit Menge und Akkumulation des Pr^{PSc} hiermit korreliert und eine Rolle bei der Neurotoxizität spielt, werden die Ergebnisse der Immunhistochemie und Western Blot Analysen zeigen.

Monoklonale Antikörper gegen die native Form des pathologischen Prion-Proteins

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])

Gegenwärtig verfügbare monoklonale Antikörper gegen das Prion-Protein (PrP) weisen entweder die zelluläre Isoform des PrP (Pr^{PC}) oder Pr^{PC} und die pathologische Isoform (Pr^{PSc}) nach. Ausschließlich Pr^{PSc}-spezifische Antikörper wären außerordentlich hilfreich sowohl für den diagnostischen Nachweis von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien als auch für zelluläre Untersuchungen zur Umfaltungsreaktion und möglicherweise für therapeutische Ansätze. Für dieses Projekt wurden Prion

knock-out Mäuse (PrP^{0/0}), die im Gegensatz zu Wildtypmäusen immunologisch nicht tolerant gegen das Prion-Protein sind, mit verschiedenen PrP^{Sc} Antigenpräparationen immunisiert. Hier soll nur über die Verwendung von Wolframsäure (NaPTA)-gefälltem pathologischem Prion-Protein als Antigen berichtet werden. Nach Fällung wurde das Antigen zusätzlich mit Proteinase K behandelt, um zelluläres Protein und weitere unerwünschte Proteinkontaminanten aus der Präparation zu entfernen. Für diese NaPTA-gefällten, gereinigten PrP^{Sc}-Präparationen konnte die Infektiosität sowohl *in vitro* als auch im Bioassay nachgewiesen werden. Die Immunisierung erfolgte unter Verwendung eines T-Zell stimulierenden Adjuvands und einer intravenösen Verabreichung vier Tage vor der Fusion mit X63-Ag8.653 Myelomzellen. Aus den positiven Kulturen wurden fünf Hybridome näher charakterisiert, die sowohl Reaktivität gegen PrP^C als auch PrP^{Sc} zeigten.

Diese monoklonalen Antikörper binden sowohl an natives als auch an denaturiertes Prion-Protein, wie in der Fluorocytometrie und im Western Blot gezeigt. Weiterhin reagieren einige dieser Antikörper im Zell-Blot, Histo-Blot, im immunocytochemischen Nachweis und im ELISA. Für alle monoklonalen Antikörper wurden Epitopkartierungen und Bindungsstudien durchgeführt.

Therapieversuche von Mäusen mit Prionerkrankung

Stitz, L.*, Gagulić, E., Petsch, B. und Rziha, H.-J.

(in Zusammenarbeit mit C. Korth [Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf])

Prionerkrankungen sind transmissible, progredient verlaufende fatale Erkrankungen des Zentralnervensystems, die durch neurodegenerative Veränderungen gekennzeichnet sind. Generell sind neurodegenerative Erkrankungen bisher nicht therapierbar. *In vitro* konnten inzwischen eine Reihe von heterozyklischen Wirkstoffen identifiziert werden, die eine anti-Prion-Aktivität aufweisen. Insbesondere von Quinacrin, aber auch von weiteren Pharmaka, die als Antidepressiva Anwendung finden, ist bekannt, dass sie in Zellkulturmodellen die Menge des pathologischen Prionproteins reduzieren oder dieses vollständig entfernen können. *In vivo* konnten bisher nur Erfolge erzielt werden, wenn die Behandlung prophylaktisch durchgeführt wurde. Diese Situation entspricht nicht der klinisch relevanten. Wir haben deshalb im Mausmodell der Scrapieerkrankung begonnen, therapeutisch in den Verlauf der Erkrankung einzugreifen. Zu diesem Zwecke nutzen wir PrP^C überexprimierende Mäuse (tga20), die mit PrP^{Sc} intracerebral inokuliert werden. Nach Ablauf eines Drittels der Inkubationszeit wird mit einer Therapie in Form einer Kombination verschiedener heterozyklischer Wirkstoffe und deren Abkömmlingen begonnen, die allesamt die Umfaltungsreaktion des zellulären (PrP^C) in das pathologische Prion-Protein (PrP^{Sc}) beeinflussen. Weitere Ansätze der Kombinationstherapie schließen die Verwendung von neuroprotektiven Substanzen ein. Die bisherigen Ergebnisse in diesem sehr stringenten Modell (Überexpression des PrP^C und später Therapiebeginn) zeigen eine 20-25%ige Verlängerung der Überlebenszeit in Mausgruppen (n=10), wobei Einzeltiere eine Verlängerung der Überlebenszeit von bis zu 60 % aufweisen. Diese Untersuchungen sollen fortgeführt werden, wobei neben pharmakologisch wirksamen Substanzen auch die von uns hergestellten monoklonalen Antikörper zur Therapie genutzt werden sollen.

Untersuchungen zur Resistenz und Suszeptibilität 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 neue DNA-Marker vieler 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 und beprobt. Nach

23monatiger Inkubationszeit erkrankten erste Schafe mit atypischer Symptomatik und wurden aus Tier-schutzgründen getötet. Bei der Sektion wurden diverse Gewebe asserviert. In drei der fünf Tiere wurde das pathologische Prion-Protein in verschiedenen definierten Regionen des Gehirns mittels Western Blot nachgewiesen. Die diagnostische Untersuchung der übrigen Tiere steht an.

Regulation der Apoptose nach PrP^{Sc} Infektion

Bourteele, S., Oesterle, K., Gagulić, E. und Planz, O.*

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert verschiedenste Gene, die bei Immunantwort, Virusreplikation, Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind. Eine Vielzahl von Stimuli induziert verschiedene Signalkaskaden der NF- κ B Aktivierung. Die meisten dieser Signalwege streben zu dem I κ B Kinase (IKK) Signalosome Komplex, der eine wichtige Rolle für die Aktivierung von NF- κ B spielt.

Im Zentralnervensystem (ZNS) wurde NF- κ B eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben. Über eine Beteiligung des NF- κ B bei der Prionerkrankung ist noch wenig bekannt. Prionerkrankungen werden durch neurodegenerative Veränderungen des ZNS charakterisiert und mit einer Konversion des zellulären PrP^c zu einer falsch gefalteten Isoform PrP^{Sc} assoziiert. Derzeit ist unklar, ob NF- κ B Aktivierung eine Rolle bei der Änderung der Proteinkonformation und der Pathogenese spielt.

Um den Einfluss des pathologischen Prion-Proteins auf die NF- κ B Aktivierung *in vitro* zu untersuchen, haben wir Bos-2 Zellen, die sehr empfänglich für eine Infektion mit pathologischem Prion-Protein sind, mit Prion-Protein vom Stamm RML6 infiziert. Interessanterweise konnte eine erhöhte NF- κ B Bindungsaktivität in den infizierten Zellen und keine transkriptionelle Aktivierung gefunden werden. Weiterhin konnten wir bei ca. 30 % der infizierten Zellen Apoptose unter der Beteiligung von Mitochondrien nachweisen. Um die Rolle von NF- κ B *in vivo* zu untersuchen, haben wir NF- κ B1, NF- κ B2 und Bcl3 Knockout Mäuse mit PrP^{Sc} infiziert. Nach intrazerebraler (i.c.) Infektion erkrankten die NF- κ B2 und Bcl3 Knockout Tiere im Vergleich zu Kontroll-Mäusen früher. Zudem zeigten immunhistologische Analysen elf Wochen nach der Infektion verstärkte Apoptose im Gehirn der NF- κ B2 und Bcl3 Knockout Tiere im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen. Zum selben Zeitpunkt war die Expression von Bcl-xL im Gehirn der NF- κ B2 und Bcl3 Mäuse reduziert. Bcl-xL steuert die mitochondriale Apoptose und wird durch NF- κ B reguliert. Diese Untersuchungen zeigen eine neuroprotektive Rolle von NF- κ B im zentralen Nervensystem nach Prion-Infektion.

Etablierung Reporter-gen-markierter infektiöser Prion-Proteine

Baumgartner, A., Wienhold, D., Fuchs, C., Arzt, C. Büttner, M. und Pfaff, E.*

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems, zu welchen u.a. die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD), Kuru und die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) gehören.

Diese 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, mittels deren die Expression der rekombinanten Prion-EGFP-Fusionsproteine nach Infektion in SF9 Zellen nachgewiesen werden konnte. Anschließend war es möglich, die Fusionsproteine denaturierend aufzureinigen und in *in vitro* Konversionsversuchen zu analysieren.

Europäisches Netzwerk der Surveillance und Bekämpfung von TSE in kleinen Wiederkäuern Kramer, M.*

Dieses von der Europäischen Union als Concerted Action 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: Epidemio-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).

Epidemiologische Untersuchungen zu Einflussfaktoren des Auftretens der BSE in der Bundesrepublik Deutschland unter Verwendung von BSE-Falldaten und der nationalen Rinderdatenbank (HI-Tier)

Pottgießer, C.*, Selhorst, T., Conraths, F.J. und Kramer, M.

Mit dem Auftreten der ersten BSE-Fälle in Deutschland im Jahr 2000 ist hinsichtlich Verbraucherschutzrelevanter Kriterien die Sammlung und epidemiologische Analyse von Daten zu festgestellten BSE-Fällen unabdingbar. Weitere Erkenntnisse über das Auftreten und die Verbreitung von BSE-Fällen in Deutschland können über Risikobewertungen erlangt werden. Im Rahmen eines vom BMELV geförderten auf drei Jahre befristeten Forschungsprojektes werden die für die Untersuchungen zur BSE-Epidemiologie entwickelten Berichtsbögen den zuständigen Veterinärbehörden mit der Bitte um Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Die daraus zu jedem einzelnen BSE-Fall erhobenen Daten werden gesichtet, auf Vollständigkeit und Plausibilität überprüft und in einer BSE-Falldatenbank erfasst. Zusätzlich werden auch die verfügbaren Daten aus dem Herkunfts- und Informationssystem für Tiere (HI-Tier) ausgewertet. Um die Beobachtungen in den Falldaten gegenüber der Durchschnittspopulation vergleichen zu können, wurde in ausgewählten Gebieten eine Studie durchgeführt, in der über einen anonymen Mail-Survey Vergleichsinformationen (z.B. Einsatz von Milchaustauscher-Futtermitteln in der Rinderfütterung in den 90er Jahren) eingeholt wurden. Diese Daten werden in einer Referenzdatenbank verwaltet.

4 PARASITEN

4.1 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.

Am Institut für Epidemiologie des FLI 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 von Methoden zum Nachweis von *N. caninum* bei abortierten Rinderföten

Schaes, 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. Mehrere spezifische Klone wurden gewonnen, die derzeit auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden.

Studien zur geographischen Verteilung von *N. caninum*-Infektionen und zu möglichen Risikofaktoren

Schaes, G.*, von Blumröder, D., Staubach, C., Ziller, M., Fröhlich, A. und Conraths, F.J.

In Zusammenarbeit mit dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz und dem Landeskontrollverband Rheinland-Pfalz e.V. wurde im Rahmen eines EU-Projekts eine Querschnittsstudie zur *N. caninum*-Seroprävalenz bei Milch- und Fleischrindern in Rheinland-Pfalz durchgeführt. Parallel zur Probengewinnung wurden auch Fragebögen an die teilnehmenden Rinderhalter ausgegeben und die gewonnenen Daten in einer Risikofaktoranalyse verwendet. Ein optimiertes logistisches Regressionsmodell zur Beschreibung möglicher Risikofaktoren für *N. caninum*-Infektionen in Milchviehherden beinhaltete die Eingabevariablen „Hundedichte im Landkreis“ und „Anwesenheit eines oder mehrerer Hofhunde bei der Herde“ als potentielle Risikofaktoren ($P < 0,05$). Bei einer vergleichbaren Analyse der zu Mutterkuhherden erhobenen Daten konnte lediglich die Eingabevariable „Mittlere Lufttemperatur im Juli im Landkreis“ als potentieller Risikofaktor identifiziert werden ($P < 0,05$).

Um die Bedeutung des potentiellen Risikofaktors „Hundedichte“ besser einschätzen zu können, wurden 24.089 Hundekotproben, die zwischen März 2001 und Oktober 2004 an zwei in Baden-Württemberg liegende private veterinärmedizinische Untersuchungslabore (Tierärztliches Labor Freiburg, VetMedLabor GmbH) eingesendet worden waren, auf protozoäre Infektionserreger untersucht. 47 (0,2 %) der Proben enthielten Oozysten, die morphologisch denen von *Hammondia heydorni* und *N. caninum* ähnelten. Die Oozysten-Isolate von 29 Hunden wurden am FLI weiter untersucht und zur Speziesbestimmung in Gerbils (*Meriones unguiculatus*) inokuliert. Sieben Isolate induzierten in den Versuchstieren eine spezifische Antikörperantwort gegen Antigene von *N. caninum*-NC-1-Tachyzoiten, d.h. diese Isolate enthielten *N. caninum*. Bei zwei Isolaten erkrankten die inokulierten Gerbils und *Toxoplasma gondii* konnte aus ihren Körpergeweben isoliert werden. Die restlichen Isolate induzierten weder eine Antikörper-Antwort gegen *N. caninum* noch gegen *T. gondii*.

Studien zur Rolle von *N. caninum* als Aborterreger beim Rind

Schaes, 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.

Untersuchungen zu protozoär bedingten Reproduktionsverlusten bei landwirtschaftlich genutzten Wiederkäuern

Schaes, 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) aufzureinigen lässt.

Weitere Projekte

Aufklärung des Lebenszyklus der Hammondien des Fuchses

Meyer, J., Conraths, F.J. und Schares, G.

Untersuchungen der *In-vitro*-Induktion von Gewebezysten bei den Hammondien des Fuchses und des Hundes

Meyer, J., Conraths, F.J. und Schares, G.

Entwicklung serologischer Methoden zum Nachweis von *N. caninum*-Infektionen in fötalen Flüssigkeiten abortierter Rinderföten

Schares, G. und Conraths, F.J.

4.2 ECHINOCOCCUS MULTILOULARIS

Räumlich-zeitliche Analysen zur Epidemiologie des Kleinen Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*

Tackmann, K.*, Staubach, C. und Conraths, F. J.

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 die auch für den Menschen infektiösen Eier mit der Losung aus. Diese bleibt über Monate an der bodennah wachsenden Vegetation infektiös. Natürliche Zwischenwirte sind Nager, die sich durch orale Aufnahme der Eier infizieren und das Larvenstadium in nahezu allen Fällen in der Leber beherbergen. Der Lebenszyklus schließt sich über die Räuber-Beute-Beziehung der End- und Zwischenwirte. Der Mensch infiziert sich als Fehl-Zwischenwirt.

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 Risikobewertungen 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 epidemiologisches Neuland. Daher ist dies auch ein Modellprojekt über die Erreger-orientierte Fragestellung hinaus. Zur Bearbeitung dieser Aufgabe muss eine geeignete Datenbasis (Datum und digitalisierter Ort der Streckung, diagnostischer Befund, andere epidemiologisch relevante Informationen, Stichprobendichte) geschaffen und über längere Zeiträume fortgeschrieben werden. Eigene Untersuchungen gestreckter Füchse, zunehmend auch Marderhunde (Einsendungen durch Unterstützung aus verschiedenen anderen Projekten) bilden den belastbaren Daten-Kernbereich, daneben wurden in Kooperation auch andere Datenbasen für dieses Projekt nutzbar gemacht und eingebunden. Das schließt auch die Evaluierung und Harmonisierung der diagnostischen Methoden ein sowie die Prüfung, ob mit im Freiland gesammelten Losungsproben die regionale epidemiologische Situation überwacht werden kann. Zur Verarbeitung dieser Daten wurden neue epidemiologische 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.

4.3 TRITRICHOMONAS FOETUS

Henning, K.* und Conraths, F.J.

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 von *T. foetus* von kontaminierenden Trichomonaden. Somit ist es möglich, positive Kulturresultate zu überprüfen und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Die PCR kann auch direkt, 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 am Friedrich-Loeffler-Institut eingesandt und dort typisiert werden.

5 PATHOPHYSIOLOGIE UND LUNGENFUNKTIONSDIAGNOSTIK

Wie reagieren die Gefäße im pulmonalen Kreislauf bei Atemwegs- und Lungenerkrankung?

Reinhold, P.* und Höchel, P.

Der pulmonale Kreislauf ist funktionell eng mit den Belüftungsverhältnissen in der Lunge verknüpft. In der Regel führt jede Form von alveolärer Minderbelüftung (Hypoventilation bzw. alveoläre Hypoxie) zu einer Konstriktion der kleinen präkapillaren Pulmonalarterien. Spezies-spezifische Besonderheiten in der funktionellen Kopplung zwischen alveolärer Belüftung und Durchblutung begründen sich aus erheblichen anatomischen Unterschieden in der Struktur der Atemwege und des pulmonalen Gefäßbettes.

Im Rahmen tierexperimenteller Studien wurde untersucht, welche pathophysiologischen Konsequenzen sich für die Gefäße im pulmonalen Kreislauf von Kälbern ergeben, wenn die Lungenfunktion infolge verschiedenster Einflussfaktoren (z.B. Broncho-Pneumonien, LPS-Belastungen, Sepsis, Transportstress oder Inhalation kalter Luft) beeinträchtigt ist. Hierfür erfolgen Druck- bzw. Widerstandserhöhungen im pulmonalen Gefäßbett (*A. pulmonalis*) an insgesamt 74 Tieren mittels Rechtsherzkatheterisierung.

Erkrankungen der Atemwege, die mit einer Minderbelüftung von nachgeordneten Alveolarbezirken einhergehen, führen bei Tierarten, deren Lungen über keine kollateralen Atemwege verfügen (wie Rind und Schwein), zu ausgedehnten regionalen alveolären Sauerstoffmangelzuständen (Hypoxie) bzw. zu nicht belüfteten Lungenarealen (Atelektasen). Aufgrund einer starken Muskelschicht in den kleinen Lungenarterien reagiert das pulmonale Gefäßbett von Rindern und Schweinen zugleich sehr empfindlich auf alveoläre Hypoxie. Hieraus resultiert für die beiden genannten Tierarten, dass Atemwegs- und Lungenerkrankungen in weitaus stärkerem Maße von Blutdruckerhöhungen im pulmonalen Kreislauf begleitet werden als dies beispielsweise bei Pferden, Hunden oder Katzen der Fall ist.

Fazit: Rind und Schwein gehören aufgrund anatomischer und physiologischer Besonderheiten im pulmonalen Gefäßbett zu den Tierarten, bei denen ein Sauerstoffmangel im Alveolarraum (z.B. bei Atemwegs- und Lungenerkrankungen) zu einer ausgeprägten pulmonalen Hypertonie führt. Folglich sind diese Spezies stärker prädisponiert, eine Rechtsherzinsuffizienz (*Cor pulmonale*) zu entwickeln als andere Tierarten. Diese Tatsache ist bei der Etablierung von Tiermodellen zu berücksichtigen.

Weitere Projekte

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.

6 HISTOLOGISCHE, IMMUNHISTOLOGISCHE UND ULTRASTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN

Vergleichende Untersuchungen zur Ultrastruktur verschiedener Orthomyxoviren

Granzow, H.*, Fichtner, D., Starick, E., Lange, E. und Werner, O.

Widersprüchliche Literaturangaben zur Ultrastruktur von Orthomyxoviren waren Anlass zu eigenen Untersuchungen. Aviäres Influenzavirus, equines Influenzavirus, porcines Influenzavirus, Virus der infektiösen Anämie der Lachse und ein Isolat vom Koi-Karpfen wurden in Ultradünnschnitten infizierter Zellkulturen elektronenmikroskopisch untersucht. Dies erforderte eine spezielle Fixierung und Einbettung als Monolayer. Ultradünnschnitte wurden dann in einem Winkel von 90° zur Unterlage angefertigt.

Alle Viren entstanden durch einen Knospungsprozess an der Zellmembran. Dieser Vorgang führte bei allen untersuchten Virusspezies ausschließlich zur Bildung filamentöser Partikel unterschiedlicher Länge. Sphärisch erscheinende Partikel erwiesen sich nach Objektkipfung als Schnittebene der Partikelbasis an der Knospungsstelle. Querschnitte der filamentösen Virionen ließen Anschnitte einzelner RNP-Stränge erkennen. In Längsschnitten erschienen diese Strukturen apikal gebunden.

Nach Ablösung der Virionen von der Zellmembran trat bei allen Virusspezies in der Regel eine deutliche Formänderung ein. Die überwiegende Zahl der Partikel nahm dabei ein pleomorphes Aussehen an. So lässt sich zwar die oft sphärische Partikelmorphologie in Suspensionen erklären, sie spiegelt aber nicht die ursprünglich filamentöse Reifungsstruktur der Virionen wider.

Nachweis von Picornaviren in zytopathogenen Isolaten von Maus und Aal Granzow, H.*, Fichtner, D., Dauber, M. und Schirrmeier, H.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von zytopathisch veränderten Zellkulturen (murine Neuroblastomzelle und EK-1 Zelle vom Aal) nach Inokulation mit angeriebenem Gewebematerial aus Organeinsendungen von einer Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*; Gehirnhomogenat; diagnostische Indikation: Personenkontakt mit Erkrankung unklarer Genese) und erkrankten Aalen (*Anguilla anguilla*; Herz, Milz, Niere, Gehirn von Tieren aus Reusenfang und Hälterung) führten bereits in unbehandelten Sedimenten zum morphologischen Nachweis von Picornaviren. Die nach Reinigung und Anreicherung der zwei Isolate bestimmten Partikeldurchmesser (Negativkontrast mit PWS, pH 6.0) betragen 28-30 nm bei dem Virusisolat aus der Maus und 30-32 nm bei dem Virusisolat aus Aalen.

Die parallel durchgeführten Ultradünnschnittuntersuchungen infizierter Zellkulturen (murine Neuroblastomzelle und EK-1 Zelle vom Aal) ließen im Verlauf beider Virusinfektionen die für eine Picornavirusreplikation typische Hypertrophie der Zellen und die durch Membranproliferation ausgelösten kleinvakuoligen Veränderungen im Zytoplasma erkennen. Vereinzelt traten pseudokristallin aggregierte Picornaviruspartikel im Zytoplasma auf.

Ultrastrukturelle Befunde nach Induktion von persistenten Formen von *Chlamydomyxa psittaci* in Hep2-Zellen

Liebler-Tenorio, E.M.*, Göllner, S. und Sachse, K.

Die Fähigkeit von Chlamydien, in ein Persistenzstadium überzugehen, ist ein wichtiger Pathogenitätsmechanismus bei Chlamydieninfektionen, da der persistierende Erreger zwar lebensfähig, aber nicht anzüchtbar ist und da das Immunsystem nicht fähig ist, persistierende Chlamydien zu eliminieren.

In der vorliegenden Untersuchung wurde in infizierten Zellkulturen Persistenz mit drei verschiedenen Methoden induziert: durch die Behandlung mit Penicillin G (Pen G), durch Eisendepletion mit Deferoxaminmesylat (DAM) und durch Zugabe von IFN- γ . Die Hep2-Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion (Stunden pi) und der jeweiligen Behandlung in Glutaraldehyd fixiert und in Araldit Cy212 eingebettet. Infizierte, aber unbehandelte Hep2-Zellen dienten als Kontrollen. Die Ultradünnschnitte wurden in einem Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai 12, FEI) untersucht. In den unbehandelten Zellen waren 48 Stunden p.i. große Einschlüsse mit zahlreichen Elementarkörperchen (EB), zahlreichen Intermediärkörperchen und wenigen Retikularkörperchen (RB) zu finden. Die Zugabe von DAM, Pen G oder IFN- γ führte zu kleineren Einschlüssen, vergrößerten RB und wenigen/keinen EB. Die verschiedenen Behandlungen führten zu morphologisch unterschiedlichen Persistenzformen. Nach Zugabe von DAM waren etwa doppelt so große RB wie bei den Kontrollen zu finden. Die RB hatten eine unregelmäßige Form und unter ihrer welligen äußeren Membran wurden kleine sich abschnürende Körperchen beobachtet. Es waren zahlreiche membranumschlossene Vesikel im Einschluss zu finden. Die Behandlung mit Pen G resultierte in Einschlüssen mit wenigen, dicht aneinander gelagerten RB. Innerhalb desselben Einschlusses variierte die Größe der RB von normal bis zu 10fach vergrößert. Besonders die sehr großen RB zeigten ein wenig elektronendichtes Zytoplasma, das von einem lockeren Netzwerk aus Filamenten und elektronendichten Herden durchzogen war. Multifokal traten Ablagerungen von elektronendichtem Material an der äußeren Membran der RB auf. Die Behandlung mit IFN- γ führte zu Einschlüssen mit 2- bis 4-fach vergrößerten, unterschiedlich geformten RB mit verklumptem Zytoplasma in der Peripherie und amorphem, granulärem Material im Zentrum. Die morphologischen Unterschiede, die nach den verschiedenen Behandlungen beobachtet wurden, deuten auf unterschiedliche Wege bei der Entwicklung der Persistenzstadien der Chlamydien hin und korrelieren gut mit Unterschieden, die bei der RNA-Expression beobachtet wurden. In weiterführenden Studien soll die Antigenexpression während der Persistenzinduktion durch die verschiedenen oben beschriebenen Methoden mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie untersucht werden.

Histologische Befunde nach experimenteller Infektion von Broilerküken mit Rotavirus Gruppe A und/oder Gruppe D

Liebler-Tenorio, E.M.* und Otto, P.

Durch experimentelle Infektion sollte die Fähigkeit verschiedener Rotaviren überprüft werden, Darmveränderungen bei Broilerküken auszulösen, die ursächlich für das *runting and stunting syndrome* (RSS) sein könnten. Wie bereits beschrieben, wurden Gruppen von Broilerküken am Tag 0 mit Rotavirus (RV) der Gruppe (gp) A, der gpD oder einer Kombination von RV gpA und gpD inokuliert. Weitere Gruppen erhielten Darmhomogenat von Tieren aus einer Herde mit RSS (positive Kontrolle) oder Puffer/Zellmedium (negative Kontrolle). Am Tag 7 wurden Küken aus der negativen Kontrollgruppe zu den anderen vier Gruppen zugestellt. An den Tagen 1, 3, 6 und 20 nach der Inokulation (p.i.) bzw. an den Tagen 3, 6 und 20 nach der Zustallung (p.c.) wurden jeweils fünf bis sieben Küken seziiert und Gewebeproben aus dem Duodenum, dem mittleren und distalen Jejunum, Caecum, Colon sowie Kropf, Magen, Pankreas, Lunge, Herz, Leber, Milz, Bursa Fabricii und Metatarsalgelenk in Formalin fixiert bzw. teilweise schockgefroren oder in Glutaraldehyd fixiert. Im Folgenden sollen nur die histologischen Befunde aus dem Dünndarm dargestellt werden. Bei den Küken der negativen Kontrollgruppe war eine altersabhängige deutliche Zunahme der Schleimhautdicke und der Zottenlänge zu finden. Nach Inokulation bzw. Kontakt mit RV gpA traten keine Läsionen in der Darmschleimhaut auf. An den Tagen 6 p.i. und 3 und 6 p.c. waren die Zotten länger als bei den Tieren der negativen Kontrollgruppe. Nach Inokulation mit RV gpD, RV gpA und gpD oder dem Darmhomogenat waren eine ausgeprägte Zottenatrophie und eine Krypthyperplasie im mittleren und distalen Jejunum, insbesondere an den Tagen 3 und 6 p.i., zu finden. Nach Zustallung waren insbesondere bei Tieren, die zu RV gpA und gpD oder zu der positiven Kontrollgruppe Kontakt hatten, Zottenatrophie und Krypthyperplasie am Tag 6 p.c. zu finden. Bei den Küken, die nur zu RV gpD Kontakt hatten, waren nur am Tag 3 p.c. bei zwei der fünf Tiere Veränderungen zu finden. Die Befunde bestätigen, dass RV gpD vergleichbare Darmveränderungen wie Darmhomogenat von Tieren aus erkrankten Herden mit RSS verursacht. Eine morphometrische Auswertung zur Objektivierung der Daten und ultrastrukturelle Untersuchungen zur Korrelation von Veränderungen und Erregernachweis im Gewebe sollen durchgeführt werden.

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.

Pathologie der Jena-Virus-Infektion des Kalbes

Liebler-Tenorio, E.M., Otto, P., Elschner, M. und Berndt, A.

Pathologie von subklinischen/chronischen Infektionen der Lunge mit *Chlamydia* spp. beim Rind

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

7 DIAGNOSTIKENTWICKLUNG UND NEUE NACHWEISVERFAHREN

Neue diagnostische Verfahren: Entwicklung und Etablierung von diagnostischen (RT) *real-time* PCR-Systemen

Hoffmann, B.* und Beer, M.

Die *real-time* PCR-Technologie hat entscheidende Vorteile gegenüber der gel-basierten Detektion von PCR-Produkten. Im Bereich der Virusdiagnostik sind die herausragenden Eigenschaften der *real-time* PCR vor allem die Zeitersparnis, die hohe Sensitivität, die Minimierung von Kontaminationen sowie die Quantifizierung der nachzuweisenden Genome/Nukleinsäuren.

Für den Genomnachweis verschiedener animaler Viren wurden entsprechende (RT) *real-time* PCR-Systeme entwickelt bzw. etabliert. Eine Zusammenstellung der Tests für die verschiedenen Viren zeigt Tabelle 1. Zur Überprüfung der Extraktion und/oder der Amplifizierung der Nukleinsäure wurde ein heterologes internes Kontrollsystem (IC) entwickelt. Dieses IC-System wurde genutzt, um mit einer Vielzahl der in Tabelle 1 aufgeführten Virus-spezifischen Tests optimierte duplex RT-PCR-Systeme zu entwickeln, wobei der Schwerpunkt auf dem Nachweis der anzeigepflichtigen Tierseuchen lag.

Tabelle 1:

Virus	Primer- und Sondenableitung	Targetsequenz	Targetlänge (bp)
CSFV	Eigenentwicklung	5'-NTR	93
Panpesti/BVDV	Eigenentwicklung	5'-NTR	ca. 200
FMDV	modif. nach Rasmussen et al.	3D-Gen	182
ASFV	-nach King et al. (2003)	VP72-Gen	250
	-OIE Methode (SyberGreenI)	VP72-Gen	278
	-nach Agüero et al. (2003) (SyberGreenI)	VP73-Gen	257
AIV	-nach Spackmann et al. (2002)	M-Gen	101
	-nach Spackmann et al. (2002)	HA-5/HA-7-Gen	130/99
	-nach Ng et al. (2005)	HA1-5-Gen	82
	-nach Payungporn et al. (2005)	N1-Gen	110
	-Eigenentwicklung	HA-5-Gen	106
	-Eigenentwicklung	HA-7-Gen	148
Tollwutvirus	-nach Wakeley et al. (2005)	N-Gen	111
	-Eigenentwicklung	N-Gen	180
OvHV-2	nach Hüsey et al. (2001)	Tegumentprotein	131
RHDV	Eigenentwicklung	VP60	104
BHV-1	Eigenentwicklung	gD-/gE-Gen	65/84
WNFV	Eigenentwicklung	5'NTR/NS2a	84/64
PRRSV	modif. nach Egli et al. (2001)	ORF7	105(US)/96(EU)
pCV-2	nach Larochelle et al. (1999)	ORF2	263
NDV	nach Wise et al. (2004)	M-gene	121
SVDV	modifiziert Reid et al. (2004)	5'-NTR	79/69
Hendra Virus	nach Smith et al. (2001)	M-Gen	69
Nipah Virus	nach Guillaume et al. (2004)	NP-Gen	105

Entwicklung von diagnostischen Nachweisverfahren für neue Infektionserreger

Hoffmann, C.* und Groschup, M.H.

Das Nipah-Virus, das bei Schweinen ein so genanntes „porzines respiratorisches und Enzephalitis-Syndrom“ (PRES) auslöst, wurde erstmalig im September 1998 in Malaysia diagnostiziert. Das Virus zeigte ein starkes zoonotisches Potential und führte bei 285 Menschen, die in Kontakt mit den Schweinen kamen, zu Enzephalitiden und Pneumonien, bei 120 der Betroffenen mit tödlichem Ausgang. Zur Bekämpfung der Nipah-Epidemie wurden mehr als eine Million Schweine gekeult, was zum Ruin von zwei Dritteln der großen Schweinefarmen in Malaysia führte. Hendra-Virus wurde erstmals 1994 bei erkrankten Pferden in Australien identifiziert. Auch das Hendra-Virus führte zu letalen Infektionen des Menschen.

Nipah- und Hendra-Viren gehören zur Familie der Paramyxoviren und bilden zusammen das neue Genus *Henipavirus*. Die Sequenzhomologie zwischen diesen beiden Pathogenen liegt bei 78 %. Für beide Viren wurden Protokolle zur spezifischen Detektion mittels *real-time* PCR etabliert, die auf bereits bekannten

Ansätzen (Smith et al., 2001, J. Virol. Meth. **98**:33-40; Guillaume et al., 2004, J. Virol. Meth. **120**:229-237) beruhen.

Darüber hinaus ist auch der Aufbau von diagnostischen Nachweissystemen für Pferdeenzephalitis-Viren, Hanta-Viren und West-Nile-Viren in Vorbereitung.

Microarray-Hybridisierung zur Detektion von Viruskontaminationen in Bioprodukten

Koch, N., Wienhold, D., Daeke, S., Büttner, M. und Pfaff, E.*

(in Zusammenarbeit mit Schmidt, K. [Boehringer Ingelheim])

Empfindliche, leicht anwendbare Nachweismethoden zur Detektion von Viruskontaminationen in Bioprodukten erfordern zunächst die Erfassung eines möglichst breiten Spektrums der in Frage kommenden Viren. Dazu sind am besten Microarrays geeignet, die über Hybridisierungen im Nanomaßstab ein schnelles Screening von Virusnukleinsäuren erlauben. Zur Virusfamilien-repräsentativen Erfassung wurden Primer und Sonden selektiert, die ein Spektrum hoch konservierter Sequenzen abdecken. Zur Sondenherstellung wurden PCR-amplifizierte virale Nukleinsäureabschnitte verwendet, die mit selektierten Oligonukleotiden oder mit spezifischen klonierten DNA-Fragmenten auf Microarrays hybridisiert wurden. Die Nukleinsäurehybride wurden durch Fluoreszenzmarkierung der Sonden detektierbar gemacht. Die praktische Anwendbarkeit der Microarray-Hybridisierung konnte nach Extraktion von Nukleinsäurematerial aus in Zellkultur erhaltenen Viren mit anschließender Markierung an selektierten Beispielen gezeigt werden.

8 ZELLBANK UND VIRUSSTAMMHALTUNG

8.1 ZELLBANK FÜR ZELLINIEN IN DER VETERINÄRMEDIZIN

Riebe, R.* und Lenk, M.

Aufnahme neuer Zelllinien in die Zellbank (ZB):

Im Berichtszeitraum wurden 42 Zelllinien in die ZB aufgenommen. Dabei handelt es sich um:

- 8 etablierte Linien aus anderen wissenschaftlichen Einrichtungen des In- und Auslandes (Schwein, Maus, Mensch, Fisch, Insekten),
- 9 Neuzüchtungen der ZB, deren Linienentwicklung nicht abgeschlossen ist (Kaninchen, Känguru, Feldhase, Leopard, Lama, Schwein, Trampeltier),
- 16 gentechnisch veränderte Linien verschiedener Arbeitsgruppen des FLI und anderer wissenschaftlicher Einrichtungen,
- 9 Hybridome verschiedener Arbeitsgruppen des FLI und anderer Institute.

Aktueller Linienbestand der Zellbank 2005:

- 1.026 Zelllinien von 45 Tierspezies (Känguru, europäischer Feldhase, Leopard, Lama, Trampeltier als Spezies hinzugekommen) und Mensch

Abgaben aus der Zellbank 2005:

Im Berichtszeitraum erfolgten 1.450 Zellabgaben von etwa 220 verschiedenen Zellsystemen. Dazu gehörten:

- 152 Abgaben von 68 verschiedenen Zelllinien an Institute in Deutschland, Schweiz, Spanien, Türkei, Luxemburg, Frankreich, Niederlande, Italien, Chile, England, Slowakei, Slowenien, Indien und Österreich.
- 1.249 Abgaben von 205 verschiedenen Zellsystemen an Institute des FLI.
- Neben etablierten Zelllinien wurden kontinuierlich Primärzellen (embryonale Hühnerfibroblasten) und primärnahe Kultursysteme aus Kryovorräten (z.B. Ferkel- und Kälbernieren, Kälberschilddrüsen u.a.) zur Verfügung gestellt (insgesamt 15,6 Liter Zellsuspension).

- Es wurden insgesamt 3.308 Liter von mehr als 35 verschiedenen Zellzuchtmedien und -lösungen gebrauchsfertig bereitgestellt. Der dazu notwendige Serumverbrauch betrug 225 Liter FKS und 18 Liter Rinderserum eigener Herstellung, umfangreiche Serumprüfungen inbegriffen.

Arbeiten zur Zellcharakterisierung und Standardisierung:

- Bestimmung der allgemeinen Wachstumscharakteristika der Neuaufnahmen und der Neuanzüchtungen;
- regelmäßige Charakterisierung der Linien durch Karyotypisierung (Ermittlung der Stemline, Erstellung von Karyogrammen), 16 Linien im Berichtszeitraum;
- wöchentliche Mykoplasmenkontrolle aller sich in Kultur befindlichen Zelllinien mit Kulturmethode, DNS-Färbung und PCR (1.958 Einzeluntersuchungen an 171 Zelllinien in Zusammenarbeit mit dem bakteriologischen Labor, U. Polster);
- regelmäßige Fremdviruskontrolle mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik, PCR und Elektronenmikroskopie (Labor H. Granzow) unter anderem zum bevorzugten Nachweis des BVD-Virus (Einzelkontrolle jeder FKS-Flasche, ständige Kultivierung verschiedener Suchlinien);
- Blutabnahme bei den Zellbank-eigenen Rindern und Herstellung hochwertiger, sicher BVDV-freier Zellzuchtseren;
- regelmäßige Authentizitätskontrolle von Linien per PCR *cell typing* (Analyse des Intron G des Aldolasegens), Spezies-spezifischer PCRs (CIB-A Kit/Cibus Biotech GmbH) und PCR-RFLP von mitochondrialer DNS;
- Charakterisierung und Identitätskontrollen von Zellen mittels Isoenzymanalyse;
- Kryokonservierung von 1.389 Ampullen verschiedener Zelllinien (insgesamt 114).

Weitere Arbeiten:

- Arbeiten zur weiteren Linienentwicklung bereits vorgestellter Neuanzüchtungen konnten erfolgreich fortgeführt werden. Durch Alteration zur Permanenz sind einige neue permanente Zelllinien entstanden: z.B. Kaninchen (Thymus, adult), Rind (Darmzellen, embryonal; Anlage der Milchdrüse, embryonal) ovines PrP^c transgene Maus (Gehirn, neugeboren).
- Zwei Versuche zur Anzucht von Zellen aus Nabelschnur- bzw. Nachgeburtmaterial zweier asiatischer Elefanten schlugen fehl, von einem dritten Tier gelang es, Zellen aus Nabelschnurgewebe in Kultur zu bringen, allerdings mit einer sehr geringen Wachstumspotenz.
- Für das Tollwut-Referenzzentrum und zur Weitergabe an Dritte wurden größere Mengen an mAk in Form von Zellkulturüberständen von verschiedenen Hybridomen bereitgestellt.
- Für MKS-Virus-Empfänglichkeitsstudien wurden diverse Zelllinien von Rind, Schaf und Ziege sowie primäre Kälberschilddrüsenzellen bereitgestellt (Labor B. Haas).
- An mehr als 50 Zelllinien verschiedener Spezies wurden die Transfizierbarkeit und Transfektionseffizienz mit verschiedenen Methoden geprüft (Labor G. Keil).
- Für Untersuchungen zur Infizierbarkeit mit dem Scrapie- bzw. BSE-Erreger wurden mehr als 60 relevante Zellsysteme von Rind, Schaf, Ziege, Haus- und Wildschwein, Reh- und Damwild, Maus, Hamster, Kaninchen und Mensch zur Verfügung gestellt (Labor M. Groschup).
- Für Empfänglichkeits- und Replikationsstudien zum RHD-Virus des Kaninchens wurden mehr als 50 verschiedene Zelllinien bereitgestellt. Einige davon wurden eigens für diesen Zweck neu entwickelt (Labor Dr. H. Schirrmeier).
- mAk des Hybridoms ERI-1-6/Linie Nr. 912 (E. Weiland, 1989) gerichtet gegen intrazelluläres Antigen boviner Zellen erwiesen sich als sehr spezifisch und geeignet zum Speziesnachweis von Rinderzellen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten bisher drei Falschdeklarationen an Zelllinien aufgedeckt werden, die die ZB aus anderen wissenschaftlichen Einrichtungen erhalten hatte.

Mykoplasmen und Zellkulturen – Untersuchungen zur Diagnostik und Bekämpfung Polster, U.*

Die Kontamination von biologischem Material, wie z.B. Zellkulturen und Viruspräparationen, mit Mykoplasmen ist 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 2.374 Zellkulturen und Virusproben auf das Vorkommen von Mykoplasmen untersucht. 27 dieser Proben waren positiv (1,14 %). Es wurden 17-mal *Mycoplasma (M.) arginini*, 7-mal *Acholeplasma laidlawii* sowie drei nicht differenzierbare Stämme gefunden. Gyrasehemmer eignen sich nach wie vor 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 z.T. 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" Referenzstämmen dienen bzw. Krankheitsgeschehen zeitlich und räumlich dokumentieren. Nicht erfasst werden in der Regel Viren, die in nationalen Referenzlaboratorien bearbeitet werden. In die Sammlung werden vorrangig Virusstämme mit guter Datenlage aufgenommen, deren Herkunft, Identität und Kontaminantenfreiheit (einschließlich Mykoplasmen und Fremdviiren) bekannt bzw. geprüft ist. Diese Prüfung wird bei Notwendigkeit von der Virusbank veranlasst 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 ferner in der Lage, Virusstämme mit Weitergabebeschränkung zu deponieren.

Im Bestand der Virusbank befinden sich gegenwärtig gut 600 Virusstämme und -isolate in nahezu 70 Spezies von Rind, Schwein, Pferd, Hund, Katze und Geflügel, aber auch von Ziege, Schaf, Giraffe, Afrikanischem Elefant und verschiedenen Fischarten. Damit erhöhte sich deren Zahl im Vergleich zum Vorjahr merklich, was unter anderem auf die Übernahme von Isolaten aus dem Nationalen Referenzlabor für BVDV/BDV zurückzuführen ist. Der Bearbeitungsstand ist im Einzelnen unterschiedlich, ein Teil des Materials konnte bisher lediglich archiviert werden und befindet sich im Zustand wie zur Zeit seiner Übergabe an die Virusbank. Ein repräsentativer Teil der vorhandenen Stämme kann kurzfristig an Interessenten bzw. Verfügungsberechtigte abgegeben werden. Im Berichtsjahr wurden etwa 30 verschiedene Virusstämme abgegeben, diese zum Teil an mehrere Adressaten. Empfänger waren überwiegend Untersuchungsämter in den Bundesländern, Forschungsinstitute bzw. Universitäten, fünfmal private und zweimal ausländische Einrichtungen.

Vorrangig für diagnostische Zwecke wurden die Herstellung von Hyperimmunseren am Kaninchen und die Entwicklung monoklonaler Antikörper (mAK) zum Nachweis ausgewählter Viren fortgeführt. Aus diesen Arbeiten resultieren bisher mAKs zum Nachweis von H3 des aviären Influenza-A-Virus, von porzinen Tescho- und Enteroviren (PTV, PEV), dem Bovinen Respiratorischen Synzytialvirus (BRSV), dem Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV), dem Virus der Infektiösen Hämato-poetischen Nekrose (IHNV), dem Virus der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV), dem Koi-Herpesvirus (KHV), dem White Bream Virus (WBV, „Güster-Virus“), dem Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV) und den Erregern der Epizootischen Haematopoetischen Nekrose (European sheatfish and catfish virus, ESV/ECV). Gegenwärtig laufen Arbeiten zur Entwicklung von mAKs zum Nachweis weiterer Fischviren und einiger anderer.

Anpassung, Umsetzung und Betreuung des EU-Projektes „Trade Control and Expert System“ (TRACES) in Deutschland

Micklich, A.*, Kroschewski, K., 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. Ab 1.1.2005 löste es das ANIMO-System vollständig ab. In 2005 wurden mehrere neue Versionen eingeführt, die einen hohen logistischen und Betreuungsaufwand erforderten. So wurde z.B. die Verwaltung der Organisationen (Adressen der am Handel Beteiligten) vollständig neu gestaltet. Seitens des FLI wurden mehrfach verschiedene Verbesserungsvorschläge eingereicht. 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 von internationalen Datenbanken und Informationssystemen (z.B. OIE, TRACES, Eurostat, ADNS, Handistatus 2), aber auch Angaben aus Ländern dienen dem Ziel, Gefährdungspotentiale zu erkennen und Einschleppungsrisiken zu bestimmen und daraus Empfehlungen zum Risikomanagement abzuleiten.

Die Einfuhr von lebenden Tieren und Waren tierischer Herkunft aus Regionen oder Ländern mit berichtetem Vorkommen von bestimmten 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 mehr 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. und Ziller, M.

(in Zusammenarbeit mit Thulke, H.-H. [Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle]; Schach, U. [Universität, Dortmund]; Held, L., Schmid, 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 anzeigepflichtigen Tierseuchenausbrüchen. Sie unterstützen den Amtstierarzt bei der Definition von Sperrgebieten, Bestandszählungen wie auch die Planung der Bekämpfung von Tierseuchen. Mit Hilfe von GIS und neuer statistischer Analysemethoden kann man die räumliche und zeitliche Ausbreitung von Tierseuchen untersuchen und Risiken beschreiben. Daten basierend auf exakten 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 der 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* dienen als Beispiele für Überwachungsdaten in Raum und Zeit. Im Rahmen eines Twinning-Projektes in der Slowakei sowie bei Untersuchungen zur Effizienz der oralen Immunsierung 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 am Institut für Epidemiologie das Modell in enger Zusammenarbeit mit Virologen und Wildbiologen entwickelt. An Hand zeitlich und räumlich geschichteter Daten aus Wildschweinepestgefährdeten 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., Kranz, P., Kroschewski, K., Schröder, R. und Staubach, C.*

Im September 2002 wurde am Institut für Epidemiologie 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 alleine über einen Internet-Browser. Der Zugang der 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 der Restriktions- und Impfgebiete sowie eine flexible Einfärbung und Darstellung der Karten.

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
(RT) <i>real-time</i> PCR-Kits	2	Prüfung und technische Beurteilung zum Nachweis von BVDV-Genom	B. Hoffmann J. Heidrich	Insel Riems
BHV-1-Antikörper-ELISAs (gE- <i>blocking</i> , gB- <i>blocking</i> , indirekt)	21	Prüfung und Beurteilung mit Referenzmaterial und Feldproben	M. Beer P. König B. Goerl D. Reichelt	Insel Riems
KSP-Antikörper-ELISAs	7	Prüfung und Beurteilung mit Referenzmaterial und Feldproben	K. Depner	Insel Riems
KSP-Antigen-ELISAs	6	Prüfung und Beurteilung mit Referenzmaterial und Feldproben	K. Depner U. Polenz	Insel Riems
KSP-IF-Konjugat	1	Prüfung und Beurteilung mit Referenzmaterial und Feldproben	K. Depner J. Teifke U. Polenz	Insel Riems
KSP-Vakzinen	2	Prüfung der Unterlagen, Prüfung der Vakzine (z.B. Virustiter)	K. Depner	Insel Riems
BVD-Antikörper-ELISAs	6	Prüfung und Beurteilung mit Referenzmaterial und Feldproben	H. Schirrmeier H. Wege	Insel Riems
BVD-Antikörper-ELISAs	18	Prüfung und Beurteilung mit Referenzmaterial und Feldproben	H. Schirrmeier H. Wege	Insel Riems

Produkt	Menge	Zweck	Personen	Standort
Anti-CSFV FITC Konjugat	1	Chargenprüfung	J.P. Teifke	Insel Riems
Anti-CSFV monoklonaler Antikörper (BIO 275)	1	Chargenprüfung	J.P. Teifke	Insel Riems
STV-Antikörper-ELISA	2	Zulassung	E. Lange	Insel Riems
Salmonella ELISA	20	Chargenprüfung	Dr. U. Methner	Jena
Salmonella ELISA	1	Laborprüfung nach Änderungsanzeige	Dr. U. Methner	Jena
Enterisol Ileitis-ELISA von Boehringer Ingelheim (Lawsonia-intracellularis-Antikörper-ELISA für Schweineseren)	1	Zulassung und Chargenprüfung (Zulassung abgelehnt)	M. Heller	Jena
Borreliose Hund ELISA	2	Zulassung	J. Süß Ch. Klaus	Jena
Borreliose Pferd ELISA	1	Zulassung	J. Süß Ch. Klaus	Jena
Paratuberkulose-ELISA	6	Chargenprüfung	H. Köhler	Jena
PCR-Kit Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis	4	Zulassung	H. Köhler	Jena
Malleus-KBR Positivserum	2	Chargenprüfung	M. Elschner	Jena
ELISA Brucellose	2	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
SLA-Antigen Brucellose	2	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
Kontrollserum Brucellose	1	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
BGVV-B311	1	Chargenfreigabe	E. Schubert	Jena
ELISA Trikit	2	Chargenprüfung	P. Otto	Jena
ELISA TEST KIT (APP-ApxIV)	4	Chargenprüfung	A. Raßbach	Jena
Ascoli-Test Positivserum für die Milzbranddiagnostik	1	Chargenprüfung	A. Raßbach	Jena
ELISA Trikit	2	Chargenprüfung	P. Otto	Jena
ELISA Testkit	4	Chargenprüfung	T. Müller	Wusterhausen
Aujeskysche Krankheit	4	Chargenprüfung	T. Müller	Wusterhausen
Bovines Leukosevirus	2	Chargenprüfung	D. Beier	Wusterhausen
Coxiella burnetii-Infektion	1	Chargenprüfung	K. Henning	Wusterhausen
Echinokokkose	3	Chargenprüfung	K. Tackmann	Wusterhausen
Echinokokkose	1	Zulassungsgutachten	K. Tackmann	Wusterhausen
Fasziolose	1	Chargenprüfung	G. Schares	Wusterhausen
Giardiose	4	Chargenprüfung	K. Tackmann, F.J. Conraths	Wusterhausen
Kryptosporidiose	3	Chargenprüfung	K. Tackmann	Wusterhausen
Neosporose	1	Chargenprüfung	G. Schares	Wusterhausen
Sarcoptes-Räude Hund	2	Chargenprüfung	K. Tackmann	Wusterhausen
Sarcoptes-Räude Schwein	1	Chargenprüfung	K. Tackmann	Wusterhausen
Tollwut	1	Chargenprüfung	T. Müller	Wusterhausen

10.2 DIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
3 Organe/Organsuspensionen vom Wildschwein	KSPV-Typisierung ^h	Genotyp: 3 x 2.3 Rostock Phänotyp: 3 x Flandern 90	H.-G. Strebelow V. Kaden
Blister „Schweinepest-Oralvakzine“	Untersuchung auf C-Virus ^A	positiv	V. Kaden
15 PPV Working Seed	Untersuchung auf BVDV ^A	PCR BVDV-RNA positiv Virusisolierung ZK negativ	H.-G. Strebelow V. Kaden

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
58 Organproben und Isolate (Zellkulturpassagen) von Regenbogenforellen	Virusisolierung, -identifizierung, RT-PCR und Genomanalyse ^{h, A}	2 x IHNV 2 x IHNV + IPNV 3 x IPNV 2 x VHSV 40 x VHSV- und IHNV-Genotypisierung 1 x SDV 4 x Birnavirus II 4 x negativ	D. Fichtner S.M. Bergmann P.-J. Enzmann H. Granzow
10 Blutproben von Forellen	Antikörper-Nachweis ^h	5 x Antikörper gegen VHSV 4 x Antikörper gegen IPNV	S.M. Bergmann D. Fichtner
23 Organproben, Isolate (Zellkulturpassagen) und Nukleinsäure-Präparationen von Nutzkarpfen	Virusisolierung, -identifizierung, PCR und Genomanalyse ^{h, A}	9 x KHV-Genom positiv 14 x KHV-Genom und virologisch negativ	S.M. Bergmann D. Fichtner
8 Organproben und Isolat von Aalen	Virusisolierung, -identifizierung und PCR ^h	6 x Picornaviren 2 x HVA	D. Fichtner S.M. Bergmann H. Granzow
1 Isolat von einer Scholle	Virusidentifizierung ^h	Birnavirus II	D. Fichtner H. Granzow
1 Isolat vom Barsch	Virusidentifizierung ^h	Barsch-Rhabdovirus	D. Fichtner H. Granzow
2 Organproben von Welsen	Virusisolierung, -identifizierung ^h	1 x Iridoviren (ESV) 1 x negativ	S.M. Bergmann D. Fichtner
24 Lachse	Virusisolierung, RT-PCR ^{h, A}	ISAV, IHNV, VHSV, IPNV, SDV negativ	S.M. Bergmann D. Fichtner
24 Organproben von Bachforellen	Virusisolierung, RT-PCR ^h	negativ	D. Fichtner B. Köllner S.M. Bergmann H. Granzow
1 Organprobe von einer Makrele	Virusisolierung ^h	negativ	D. Fichtner
2 Isolate vom Blei	Virusidentifizierung ^h	White bream virus-like, Reovirus	D. Fichtner H. Granzow
21 Organproben vom Koi-Karpfen	PCR ^{h, A}	12 x KHV-Genom positiv 9 x KHV-Genom negativ	S.M. Bergmann D. Fichtner
10 Zierfische (3 verschiedene Spezies)	PCR ^h	LCDV-Genom negativ	S.M. Bergmann
je 3 Organe und Serumproben von Sauen	Untersuchung auf SIV bzw. Antikörper gegen SIV ^h	virologisch negativ, serologisch positiv (H3N2)	E. Lange
1 Organprobe vom Läufer Schwein	Untersuchung auf SIV ^h	positiv, H1N1	E. Lange
Formalinfixierte Gewebeproben, Pferd	Histopathologie und Untersuchung auf BPV mittels PCR und ISH ^A	19 x Equide Sarkoide	J.P. Teifke
Paraffinblöcke, Rind	Immunhistologie für CD3 ^h	5 x negativ	J.P. Teifke D. Beier
Paraffinblöcke, Rind	Immunhistologie für CD3 ^h	4 x positiv	J.P. Teifke D. Beier
13 Teschovirus-Isolate von Hausschweinen	Bestätigung und Typisierung ^h	12 x positiv PTV 1 x negativ, PTV in 8 Fällen typisierbar 1 x Mischinfektion mit mindestens 2 Serotypen	M. Dauber
3 Verdachtsfälle	Nachweis von Virus der Maul- und Klauenseuche (MKS) und Antikörpern ^h	3 x negativ	B. Haas
2 Seren von Menschen	Nachweis von MKS-Antikörpern	2 x negativ	B. Haas
4 Seren von Tieren	Nachweis von MKS-Antikörpern ^{I, E}	4 x negativ	B. Haas

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
1 Verdachtsfall	Nachweis von Virus der Vesikulären Schweinekrankheit (SVD) ^h und Antikörpern	1 x negativ	B. Haas
24 Seren vom Schwein	Nachweis von SVD-Antikörpern ^E	24 x negativ	B. Haas
345 Seren, i.d.R. vom Pferd	Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Vesikulären Stomatitis ^E	344 x negativ 1 x positiv (ausländische Probe)	B. Haas
1 Verdachtsfall	Nachweis von Virus der Afrikanischen Schweinepest ^h und Antikörpern	1 x negativ	B. Hoffmann B. Haas
1 Verdachtsfall	Nachweis von Virus der Blauzungenkrankheit ^h und Antikörpern	1 x negativ	B. Hoffmann B. Haas
2 Organe von Feldhasen	Untersuchung auf EBHS	negativ	H. Schirrmeier
42 Blut-/Serum-/Plasma-proben vom Rind	Untersuchung auf BVDV	38 x positiv 12 charakterisierte BVDV-1-Zellkulturisolate	H. Schirrmeier G. Strebelow
56 Serum-/Plasmaproben vom Rind	Untersuchung auf BVDV-AK	4 x positiv	H. Schirrmeier
93 Blut-/Serum-/Plasma-proben	Untersuchung auf BVDV und BVDV-AK	38 x BVDV AK positiv 4 x BVDV positiv	H. Schirrmeier
2 Spermaproben vom Rind	Untersuchung auf BVDV	negativ	H. Schirrmeier G. Strebelow
11 Seren von Schaf/Ziege	Untersuchung auf OHV2-AK	2 x positiv	H. Schirrmeier
Leber eines Kaninchens	Untersuchung auf RHD	negativ	H. Schirrmeier
ZKÜ vom Organmaterial einer Echse	Virusnachweis	negativ	H. Schirrmeier H. Granzow
ZKÜ von Auerchse, Ziege und Reh	Virusnachweis	negativ	H. Schirrmeier J.P. Teifke
2 Virusisolate vom Schwein	Virusnachweis und Charakterisierung	PRRSV, US-Typ	H. Schirrmeier
3 Proben vom Schwein	Nachweis von PCV 2	3 x positiv (PCR)	H. Schirrmeier
Virusisolat vom Schaf	Nachweis und Charakterisierung	BDV 2 „BDV ST1405“	H. Schirrmeier G. Strebelow B. Hoffmann
33 Blut- und Serumproben vom Schaf	Virusnachweis	2 x positiv, BDV-2 „BDV BT2305“	H. Schirrmeier G. Strebelow B. Hoffmann
ZKÜ von Organen einer Waldmaus	Virusnachweis und Charakterisierung	Picornavirus, „EMCV-like“	H. Granzow G. Keil
Organe vom Trampeltier	Virusisolierung (BVD-Verdacht)	negativ	G. Strebelow J.P. Teifke
16 Blutproben vom Rind	Untersuchung auf BVDV, BHV4, BSV, BIV	1 x BVDV positiv 9 x BVDV-AK positiv 9 x BSV-AK positiv	H. Schirrmeier
Vaginaltupfer vom Pferd	Virusisolierung (EHV2-Verdacht)	negativ	H. Schirrmeier
Organe vom Schwein	Virusisolierung (EMCV-Verdacht)	negativ	H. Schirrmeier
183 Seren von Wildwiederkäuern	Untersuchung auf Antikörper gegen Pestiviren und OHV2	22 x Pestivirus positiv 15 x OHV2 positiv	H. Schirrmeier
149 Organe, Tupfer bzw. Virusisolate von Geflügel und Ziervögeln	Identifizierung und Charakterisierung ^h	66 x PMV-1 7 x PMV-2 3 x PMV-3 1 x PMV-6 1 x PMV-7 1 x AIV H3N8 8 x AIV H5N1 (Indonesien, Vietnam) 2 x Reovirus	O. Werner E. Starick H. Granzow B. Hoffmann T. Harder
332 Organe, Tupfer bzw. Virusisolate von	Identifizierung und Charakterisierung ^A	3 x H3N8 7 x H4N6	O. Werner E. Starick

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
Wildvögeln		1 x H5N1 (HP, Dubai) 2 x H5N2 (LP) 1 x H5N3 (LP) 1 x H6N1 1 x H6N2 1 x H6N8 1 x H9N2 ca. 15 weitere Isolate in Charakterisierung	B. Hoffmann T. Harder
12 Seren von Puten	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV ^Δ	negativ	O. Werner T. Harder
545 Seren von Hühnern	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV ^Δ	negativ	O. Werner T. Harder
267 Seren von Gänsen	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV ^h	negativ	O. Werner T. Harder
9 Seren von Straußen	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV ^Δ	H5 (1 Bestand) positiv	O. Werner E. Starick
272 Seren von Enten	Untersuchung auf Antikörper gegen NDV ^h	H7 (1 Bestand) positiv H5 (1 Bestand) positiv Rest negativ	O. Werner T. Harder
12 Seren vom Pferd	serologischer Test AHS-Verdachtsdiagnostik ^h	12 x negativ	L. Stütz
10 Blutproben vom Rind 2 Seren von der Antilope	serologischer Test EHDV-Verdachtsdiagnostik ^h	12 x negativ	L. Stütz
20 Seren/Blutproben vom Rind 35 Seren/Blutproben vom Schaf	serologischer Test BTV-Verdachtsdiagnostik ^h	55 x negativ	L. Stütz
14 Seren vom Rind 36 Blutproben/Organe vom Schaf 2 Seren von der Ziege	Virus- bzw. RNA-Isolierung und PCR-Prüfung BTV-Verdachtsdiagnostik ^h	54 x negativ 1 x positiv	L. Stütz
16 BHV-1 Isolate	molekulare Charakterisierung ^h		M. Beer
2.081 Seren/Plasma vom Rind	BHV-1-Antikörpernachweis ^h		M. Beer
1.081 Seren vom Rind	BHV-1-gE-Antikörpernachweis ^h		M. Beer
12 Nasentupfer vom Rind	BHV-1-Virusnachweis ^h		M. Beer
360 Milchproben vom Rind	BHV-1-Antikörpernachweis ^Δ		M. Beer
37 Organe und Organpoole	BHV-1 Virusnachweis ^h		M. Beer
24 Impfstoffproben (BVDV, Trichophytie)	BHV-1-Virusnachweis ^Δ	24 x negativ	M. Beer
9 Zellkulturüberstände	Untersuchung auf Bovine Herpesviren ^h		M. Beer
1 Serum vom Pferd	Untersuchung auf West-Nile-Fever- Virus mittels PCR	1 x negativ	B. Hoffmann
1 Serum vom Schaf	Untersuchung auf Bluetonguevirus- Antigen mittels PCR	1 x negativ	B. Hoffmann
14 Serum-/Plasmaproben	Antikörpernachweis KSP (Differentialdiagnostik KSP) ^h	14 x negativ	K. Depner
5 EHV-1-Isolate vom Pferd	Molekulare Charakterisierung	5x positiv, EHV-1	P. König G. Keil M. Beer
6 Pferdeseren	Untersuchung auf EHV-1 und-4 Antikörper	6x positiv	P. König
1 Blutprobe Pferd	Virusisolierung	positiv für EHV-2	P. König H. Granzow

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
10x RNA, isoliert aus Zecken	Untersuchung auf FSMEV ^h	negativ	J. Süß Ch. Klaus
23 Zeckenproben (Pools)	Untersuchung auf FSMEV ^h	8 positiv, 15 negativ	J. Süß Ch. Klaus
38 Zeckenproben (Pools)	Untersuchung auf FSMEV ^A	21 positiv, 17 negativ	J. Süß Ch. Klaus
2 Zeckenproben (Pools), Schaf	Untersuchung auf Coxiellen ^A	negativ	J. Süß H. Hotzel Ch. Klaus
1x Organe von Amsel	Untersuchung auf WNFV ^h	negativ	J. Süß H. Hotzel Ch. Klaus
33 Seren vom Hund	Untersuchung auf Borrelien-AK ^h (ELISA, IgG)	10 positiv, 19 negativ, 4 fraglich	J. Süß Ch. Klaus
22 Seren vom Hund	Untersuchung auf Borrelien-AK ^h (ELISA, IgM)	1 positiv, 21 negativ	J. Süß Ch. Klaus
28 Seren vom Hund	Untersuchung auf Borrelien-AK ^h (Westernblot)	17 positiv, 8 negativ, 3 fraglich	J. Süß Ch. Klaus
10 Seren vom Pferd	Untersuchung auf Borrelien-AK ^h , (ELISA, IgG)	5 positiv, 5 negativ	J. Süß Ch. Klaus
3 Liquores (human)	Untersuchung auf FSMEV ^h	negativ	J. Süß Ch. Klaus
30 <i>Campylobacter- (C.-) fetus</i> -Isolate	Differenzierung ^A	21 x <i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i> , 7 x <i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> 2 x kein <i>C. fetus</i>	F. Schulze H. Hotzel
40 Mykobakterien-Isolate	Differenzierung ^A	16 x <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> 6 x <i>M. avium</i> ssp. paratuberculosis 3 x <i>M. chelonae</i> 3 x <i>M. farcinogenes</i> 2 x <i>M. fortuitum</i> 1 x <i>M. nonchromogenicum</i> 1 x <i>M. porcinum</i> 2 x <i>M. szulgai</i> 5 x keine Mykobakterien 1 x nicht auswertbar	H. Köhler P. Möbius H. Hotzel
48 Kotproben von Rindern	Untersuchung auf <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) ^A	4 x <i>M. avium</i> ssp. paratuberculosis 10 x negativ 34 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler
27 Darmschleimhautproben vom Rind	Untersuchung auf MAP ^A	9 x <i>M. avium</i> ssp. paratuberculosis 1 x <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> 1 x <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> 4 x negativ 12 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler
12 Kot- und Organproben vom Schaf	Untersuchung auf MAP ^A	1 x <i>M. avium</i> ssp. paratuberculosis 1 x negativ 10 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler
12 Kot- und Organproben von Ziegen	Untersuchung auf MAP ^A	2 x <i>M. avium</i> ssp. paratuberculosis 3 x negativ 7 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler
1 Kotprobe vom Springbock	Untersuchung auf MAP ^A	1 x negativ	H. Köhler

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
20 Kolostrumproben von Rindern	Untersuchung auf MAP ^A	2 x M. celatum 2 x M. lentiflavum 1 x M. porcinum 14 x negativ 1 x noch nicht abgeschlossen	H. Köhler P. Möbius H. Hotzel
1 Trockenkolostrum	Untersuchung auf MAP ^A	1 x negativ	H. Köhler
4 Seren von Pudus	Untersuchung auf Antikörper gegen MAP ^A	4 x negativ	H. Köhler
1 Serum einer Ziege	Untersuchung auf Antikörper gegen MAP ^A	1 x positiv	H. Köhler
7 Seren von Pferden	Untersuchung auf Antikörper gegen Burkholderia mallei ^h	7 x negativ	A. Raßbach M. Elschner
1 Serum vom Menschen	Untersuchung auf Antikörper gegen Burkholderia mallei ^h	1x negativ	A. Raßbach M. Elschner
68 Seren von Rindern	Abklärung nicht negativer Befunde ^h (Brucellose)	68 x negativ	F. Melzer
77 Seren von Schweinen	Abklärung nicht negativer Befunde ^h (Brucellose)	77 x negativ	F. Melzer
7 Seren von Schafen	Abklärung nicht negativer Befunde ^h (Brucellose)	7 x negativ	F. Melzer
20 Seren von Ziegen	Abklärung nicht negativer Befunde ^h (Brucellose)	20 x negativ	F. Melzer
4 Seren von Wildschweinen	Abklärung nicht negativer Befunde ^h (Brucellose)	4 x negativ	F. Melzer
1 Serum vom Hirsch	Untersuchung auf Brucellose ^A	1 x negativ	F. Melzer
9 Seren vom Mensch	Untersuchung auf Brucellose ^A	9 x negativ	F. Melzer
11 Tankmilchproben vom Rind	Abklärung nicht negativer Befunde ^h (Brucellose)	11 x negativ	F. Melzer
99 Seren von Schafen	Untersuchung auf <i>B.ovis</i> Antikörper ^E	99 x negativ	F. Melzer
5 Seren von Hunden	Untersuchung auf <i>B.canis</i> Antikörper ^E	5 x negativ	F. Melzer
11 Bakterienstämme vom Mensch	Untersuchung auf Brucella spp. ^A	10 x <i>Brucella melitensis</i>	F. Melzer
1 Bakterienstamm vom Wildschwein	Untersuchung auf Brucella spp. ^h	1 x <i>Brucella suis</i> 2	F. Melzer
1 Bakterienstamm vom Hasen	Untersuchung auf Brucella spp. ^h	1 x <i>Brucella suis</i> 2	F. Melzer
2 Lungen vom Schaf	kult. Mykoplasmenachweis ^A	2 x M. arginini	E. Schubert
6 Puteneier	kult. Mykoplasmenachweis ^A	negativ	E. Schubert
14 Agarplatten (Isolate Rind)	Stammdifferenzierung (Kultur und IFI) ^A	1 x M. bovis 5 x M. bovigenitalium 4 x M. bovirhinis 3 x M. canadense 1 x A. laidlawii	E. Schubert
11 Agarplatten (Isolate Huhn)	Stammdifferenzierung (Kultur und IFI) ^A	2 x M. gallisepticum 5 x M. gallinarum 1 x M. iners 1 x M. pullorum 1 x Mischkultur M. gallinarium/cloacale 1 x Mischkultur M. gallisepticum/iners	E. Schubert
3 Agarplatten (Isolate Taube)	Stammdifferenzierung (Kultur und IFI) ^A	2 x M. columborale 1 x M. columbinasale	E. Schubert
3 Agarplatten (Isolate Schaf)	Stammdifferenzierung (Kultur und IFI) ^A	3 x M. arginini	E. Schubert
1 Agarplatten (Isolat Katze)	Stammdifferenzierung (Kultur und IFI) ^A	1 x M. gatae	E. Schubert
42 Zellkulturen	Mykoplasmenachweis (PCR/Kultur) ^A	1 x positiv (PCR) 41 x negativ	E. Schubert

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
25 DNA-Extrakte aus Gewebe von Ferkeln	Mykoplasmenachweis (Real-Time-PCR) ^A	7 x positive, 18 x negative	K. Sachse
32 Kotproben Geflügel	Nachweis von Rotaviren mittels PAGE und PCR ^A	2 x Reovirus	M. Elschner P. Otto
16 Proben Darminhalt Huhn	Nachweis von Rotaviren mittels PAGE und PCR ^A	5 x Rotavirus Gruppe A 3 x Rotavirus Gruppe D 3 x Rotavirus Gruppe G	M. Elschner P. Otto
2 Kotproben Katze	Virusnachweis ^A	1 x Reovirus 1 x Rotavirus Gruppe A	P. Otto
47 Organproben und 22 Mykob.-Isolate von 40 Rindern	Untersuchung auf Tuberkulose/Mykobakteriose ^A	<u>Organproben:</u> M. bovis: 2 Tiere M. bovis + M. avium: 2 Tiere M. avium: 4 Tiere atypische M.: 1 Tier Keine M.: 8 Tiere Mykobakterien-Isolate: atypische M.: 16 <u>Mykobakterien-Isolate:</u> atypische M.: 16 M. caprae: 6	I. Moser, P. Möbius, H. Hotzel
47 Organproben und 72 Mykob.-Isolate vom Schwein	Untersuchung auf Tuberkulose/Mykobakteriose ^A	<u>Organproben:</u> M. avium ssp. hominissuis: 28 M. avium ssp. avium: 3 andere atypische M.: 8 <u>Mykobakterien-Isolate:</u> M. avium ssp. hominissuis: 63 M. avium ssp. avium: 9	I. Moser P. Möbius H. Hotzel
21 Organproben von 11 Hühnern / Tauben und 4 Mykob.-Isolate	Untersuchung auf Geflügeltuberkulose ^A	<u>Organproben:</u> M. avium ssp. avium: 11 Tiere <u>Mykobakterien-Isolate:</u> M. avium ssp. avium: 3 M. avium ssp. hominissuis: 1	I. Moser
70 Organproben von 23 Wildtieren und 7 Mykob.-Isolate	Untersuchung auf Tuberkulose/Mykobakteriose ^A	<u>Organproben:</u> M. avium ssp. avium: 3 Tiere M. avium hominissuis: 1 Tier M. avium ssp. paratuberculosis: 1 Tier <u>Mykobakterien-Isolate:</u> M. microti: 1 M. avium ssp. avium: 3 atypische M.: 3	I. Moser, H. Hotzel

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
61 Proben von 25 Zoo- und Heimtieren (Pony bis Kaiman)	Untersuchung auf Tuberkulose/Mykobakteriose ^A	<u>Organproben:</u> M. bovis: 5 Tiere M. tuberculosis: 2 Tiere M. tuberculosis Komplex: 1 Tier M. avium ssp. hominissuis: 2 Tiere M. avium ssp. avium: 1 Tier andere atypische M: 4 Tiere	I. Moser, H. Hotzel
8 Organproben	Untersuchung auf Bacillus anthracis ^A	negativ	A. Raßbach, M. Elschner H. Hotzel
Pferd: 4 x Blutserum 1 x Gewebe	Untersuchung auf Beschälseuche Antikörperrnachweis ^A Erregernachweis ^A	3 x negativ 1 x positiv	I. Moser E. Liebler- Tenorio
32 Kotproben, Geflügel	Nachweis von Rotaviren mittels PAGE und PCR ^A	2xReovirus	M. Elschner P. Otto
16 x Darminhalt, Huhn	Nachweis von Rotaviren mittels PAGE und PCR ^A	5xRotavirus Gruppe A 3xRotavirus Gruppe D 3xRotavirus Gruppe G	M. Elschner P. Otto
2 Kotproben, Katze	Virusnachweis ^A	1xReovirus 1xRotavirus Gruppe A	P. Otto
1 Milchprobe vom Rind	Kultur/Chlamydiennachweis PCR/Chlamydiennachweis ^A	1 x negativ 1 x positiv	E. Schubert
3 Tupferproben vom Rind	Kultur/Chlamydiennachweis PCR/Chlamydiennachweis ^A	3 x negativ 3 x positiv	E. Schubert
6 Organproben vom Rind	Kultur/Chlamydiennachweis PCR/Chlamydiennachweis ^A	6 x negativ 6 x negativ	E. Schubert
19 Milchproben vom Rind	Real-Time-PCR/ Chlamydiennachweis ^A	19 x negativ	K. Sachse
9 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/ Chlamydiennachweis ^A	1 x positiv/8 x negativ	K. Sachse
10 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/ Chlamydiennachweis ^A	10 x negativ	K. Sachse
9 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/ Chlamydiennachweis ^A	3 x positiv/6 x negativ	K. Sachse
2 Organproben vom Rind	Real-Time-PCR/ Chlamydiennachweis ^A	2 x negativ	K. Sachse
3 Zellkulturen von Mäusen	PCR/Chlamydiennachweis ^A	3 x negativ	K. Sachse
5 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^A	5 x negativ	K. Sachse
1 BAL vom Mensch	PCR/Chlamydiennachweis/ Psittakoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse
12 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^A	2 x positiv/10 x negativ	E. Schubert
12 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^A	2 x positiv/10 x negativ	E. Schubert
12 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^A	2 x positiv/10 x negativ	E. Schubert
1 Milchprobe vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^A	1 x negativ	K. Sachse
1 Tupferprobe vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^A	1 x negativ	K. Sachse
2 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^A	2 x negativ	K. Sachse
1 Tupferprobe vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^A	1 x negativ	K. Sachse
2 Tupferproben vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis Psittakoseverdacht ^h	2 x negativ	K. Sachse
55 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis Kultur/Chlamydiennachweis ^A	40 x positiv/15 x negativ 5 x positiv/26 x negativ	K. Sachse E. Schubert

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
30 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis	15 x positiv/15 x negativ	F. Melzer
25x DNA vom Schwein	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Λ	16 x positiv/9 x negativ	K. Sachse
1 Tupferprobe vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis Psittakoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse
20 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^Λ	5 x positiv/15 x negativ	K. Sachse
1 Biopsie vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis Psittakoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse
1 Organprobe vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^Λ	ohne (Gewebeautolyse)	K. Sachse
9 Kotproben von Vögeln	PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	8 x positiv/1 x negativ	K. Sachse
2 Kotproben vom Schwein	PCR/Chlamydiennachweis	2 x positiv	K. Sachse
1 Sputumprobe vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis Psittakoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse
26 Tupferproben von Geflügel	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	12 x positiv/14 x negativ	K. Sachse
4 Kotproben von Geflügel	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	1 x positiv/3 x negativ	K. Sachse
54 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis Kultur/Chlamydiennachweis ^Λ	7 x positiv/47 x negativ 3 x positiv/	K. Sachse E. Schubert
30 Serumproben vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Λ	20 x positiv/10 x negativ	F. Melzer
1 BAL vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis Psittakoseverdacht ^h	1 x positiv	K. Sachse
1 Urinprobe vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis Psittakoseverdacht ^h	1 x positiv	K. Sachse
36 Tupferproben von Geflügel	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	12 x positiv/24 x negativ	K. Sachse
5 Kotproben von Geflügel	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	3 x positiv/2 x negativ	K. Sachse
2 Organproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^Λ	2 x negativ	K. Sachse
2x DNA vom Schwein	Mikroarray/ Chlamydiennachweis ^Λ	2 x positiv	K. Sachse
3x DNA von Vögeln	Mikroarray/ Chlamydiennachweis, Ornithoseverdacht ^h	3 x positiv	K. Sachse
56 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Λ	7 x positiv/49 x negativ	K. Sachse
30 Serumproben vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Λ	7 x positiv/23 x negativ	F. Melzer
17 Tupferproben von Geflügel	PCR/Mikroarray/Chlamydien-nachweis Ornithoseverdacht ^h	17 x positiv	K. Sachse
5 Tupferproben von Geflügel	PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	5 x negativ	K. Sachse
1 Urinprobe vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis Psittakoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse
1 BAL vom Menschen	PCR/Mikroarray/Chlamydien-nachweis Psittakoseverdacht ^h	1 x positiv	K. Sachse
1 Organprobe von Taube	PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse
12 Proben vom Schaf	PCR/Chlamydiennachweis ^Λ	12 x negativ	K. Sachse
1 Organprobe vom Rind	Kultur/Chlamydiennachweis PCR/Chlamydiennachweis ^Λ	1 x negativ 1 x negativ	E. Schubert

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
4 Organproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	5 x negativ	K. Sachse
1 Organprobe vom Geflügel	PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse
5 Zellkulturen vom Geflügel	PCR/Mikroarray/Chlamydiennachweis ^Δ	5 x negativ	K. Sachse
55 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	3 x positiv/52 x negativ	K. Sachse
30 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Δ	21 x positiv/19 x negativ	F. Melzer
49 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	8 x positiv/41 x negativ	K. Sachse
29 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Δ	15 x positiv/14 x negativ	F. Melzer
53 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis Kultur/Chlamydiennachweis ^Δ	8 x positiv/45 x negativ 4 x positiv	K. Sachse E. Schubert
30 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Δ	16 x positiv/14 x negativ	F. Melzer
54 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	9 x positiv/45 x negativ	K. Sachse
30 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis	20 x positiv/10 x negativ	F. Melzer
54 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	6 x positiv/48 x negativ	K. Sachse
30 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Δ	18 x positiv/12 x negativ	F. Melzer
2 Organproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	2 x negativ	K. Sachse
2x DNA vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis Psittakoseverdacht ^h	2 x positiv	K. Sachse
5 Milchproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	5 x negativ	K. Sachse
11 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	6 x positiv/5 x negativ	E. Schubert
56 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	1 x positiv/55 x negativ	K. Sachse
30 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Δ	15 x positiv/15 x negativ	F. Melzer
1 Organprobe vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	1 x negativ	K. Sachse
3 Kotproben von Tauben	PCR/Chlamydiennachweis	3 x negativ	K. Sachse
1x DNA von Geflügel	PCR/Sequenzierung/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	1 x positiv	H. Hotzel
6 Tupferproben vom Schwein	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	2 x positiv/4 x negativ	E. Schubert
30 Organproben von Mäusen	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	30 x negativ	K. Sachse
6 Tupferproben vom Schwein	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	2 x positiv/4 x negativ	E. Schubert
6 Tupferproben vom Schwein	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	1 x positiv/5 x negativ	E. Schubert
62 Organproben vom Menschen	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	62 x negativ	K. Sachse
12 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	6 x positiv/6 x negativ	K. Sachse
1 Tupferprobe von der Taube	PCR/Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse
2 Organproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	2 x negativ	K. Sachse
1 Tupferprobe vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	1 x positiv	K. Sachse
4 Tupferproben vom Rind	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	4 x negativ	K. Sachse
1 Tupferprobe vom Vogel	PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	1 x negativ	K. Sachse

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
1 Organprobe vom Affen	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	1 x negativ	K. Sachse
1 Organprobe vom Vogel	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	1 x positiv	K. Sachse
1 Zellmedium vom Menschen	PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	1 x negativ	K. Sachse
3 Organproben von Vögeln	PCR/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	3 x negativ	K. Sachse
1x DNA von Geflügel	PCR/Sequenzierung/Chlamydiennachweis Ornithoseverdacht ^h	1 x positiv	H.Hotzel
53 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	10 x positiv/43 x negativ	K. Sachse
30 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Δ	16 x positiv/14 x negativ	F. Melzer
56 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	7 x positiv/49 x negativ	K. Sachse
29 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis ^Δ	9 x positiv/20 x negativ	F. Melzer
45 Tupferproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	32 x positiv/ 13 x negativ	K. Sachse
30 Seren vom Rind	ELISA/Chlamydiennachweis	8 x positiv/22 x negativ	F. Melzer
8 Milchproben vom Rind	Real-Time-PCR/Chlamydiennachweis ^Δ	8x negativ	K. Sachse
120 Seren vom Schwarzwild	Untersuchung auf TW-Antikörper ^Δ	1 x positiv	T. Müller
27 Seren von Hausschweinen	Untersuchung auf TW-Antikörper ^h	27 x negativ	T. Müller
1 Gehirn vom Affen	Untersuchung auf TW-Antigen ^Δ	1 x negativ	T. Müller
3 Gehirne von Fledermäusen	Untersuchung auf TW-Antigen ^Δ	3 x negativ	T. Müller
1 Gehirn vom Fuchs	Untersuchung auf TW-Antigen ^Δ	1 x negative	T. Müller
4 Gehirne vom Menschen	Untersuchung auf TW-Antigen ^Δ	4 x positiv	T. Müller
1 Gehirn vom Rind	Untersuchung auf TW-Antigen ^Δ	1 x negativ	T. Müller
2 Corneae vom Menschen	Untersuchung auf TW-Antigen ^Δ	2 x negativ	T. Müller
17 Organproben vom Menschen	Untersuchung auf TW-Antigen ^Δ	17 x negativ	T. Müller
3 Liquorproben vom Menschen	Untersuchung auf TW-Antikörper ^Δ	3 x negativ	T. Müller
8 Speichelproben vom Menschen	Untersuchung auf TW-Antigen ^Δ	1 x positiv 7 x negativ	T. Müller
29 Speichelproben von Hyänen	Untersuchung auf TW-Antigen ^h	19 x negativ	T. Müller
410 Seren vom Menschen	Untersuchung auf TW-Antikörper ^h	312 x positiv	T. Müller
15 Seren von Hunden	Untersuchung auf TW-Antikörper ^h	10 x positiv	T. Müller
59 Tollwutvirusisolate	Virustypisierung ^h	55 x Genotyp 1 1 x SAD 3 x Genotyp 5	T. Müller
285 Seren von Rindern (national)	Untersuchung auf Antikörper gegen BLV ^h	19 x positiv	D. Beier
169 Seren von Rindern (international)	Untersuchung auf Antikörper gegen BLV ^Δ	127 x positiv	D. Beier
9 Milchproben	Untersuchung auf Antikörper gegen BLV ^h	3 x positiv	D. Beier
9 Tumormaterialproben von Rindern	Untersuchung auf BLV-Provirus ^h	1 x positiv	D. Beier
209 PBMC aus EDTA-Blut	Untersuchung auf BLV-Provirus ^h	8 x positiv	D. Beier
5 Seren von Ziegen	Untersuchung auf Antikörper gegen CAEV	3 x positiv	D. Beier

Material und Menge	Zweck	Diagnose	Bearbeiter
67 Seren von Schafen	Untersuchung auf Antikörper gegen MVV	25 x positiv	D. Beier
827 Seren von Rindern	Untersuchung auf Antikörper gegen Neospora ^A	228 positiv, 599 negativ	G. Schares

^h hoheitlich

^A Amtshilfe

^I Import

^E Export

10.3 AUFGABEN IM RAHMEN DES GENTECHNIKRRECHTS

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 2005 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

AIV Stämme HPAI (z.B. H5N1, H7N1)
AIV Stämme LPAI (z.B. H5N2, H7N1)
atypische Pestiviren („Giraffe“, „Hobi“)
Border-disease-Virus 1 (BDV-1)
Border-disease-Virus 2 (BDV-2)
Border-disease-Virus 3 (BDV-3)
Bovines Enterovirus 2 (BEV-2)
Bovines Herpesvirus 1 (BoHV-1)
Bovines Parainfluenza-3-Virus (BPIV-3)
Bovines Respiratorisches Synzytialvirus (BRSV)
(Bovines) Rotavirus A (RV-A)
Bovines Rotavirus A, Genotyp G6 [P11] (4630F6)
Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV)
Equides Herpesvirus 4 (EHV-4)
Equines Rotavirus A, Genotyp G3 [P12] (00V0033E2)
Equines Rotavirus A, Genotyp G14 [P12] (00V0021F1)
Humanes Rotavirus A (Wa)
Hundestaupavirus
Koi-Herpesvirus (KHV)
Porcines Enterovirus 9 (PEV-9)
Porcines Influenzavirus H1N1 A/Swine/Bakum/5/95
Porcines Influenzavirus H3N2 A/Swine/Bakum/909/93
Porcines Parvovirus (PPV)

Porcines Rotavirus A (04V0051A5)
Porcines Teschovirus 1 (PTV-1)
Porcines Teschovirus 2 (PTV-2)
Porcines Teschovirus 4 (PTV-4)
PRRS-Virus (PRRSV)
Säuger-Reovirus 3 (MRV-3)
Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV)
Virus der Infektiösen Hämato-poetischen Nekrose (IHNV)
Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV)
Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV), Serotypen SP, AB und VR299

Bakterienstämme

Mykobakterienstämme:

M. avium ssp. hominissuis
M. kansasii
M. avium
M. avium ssp. paratuberculosis

Mykoplasmenstämme:

M. mycoides SC
M. synoviae
M. hyopneumoniae
M. meleagridis
M. pneumoniae
M. gallisepticum
M. orale
M. bovis
M. bovirhinis
A. laidlawii

AHP-Gruppe:

Hameophilus parasuis
Pasteurella multocida

Chlamydienstämme :

Chlamydophila psittaci DC29, DC5, DC14
Chlamydophila abortus DC18
Chlamydophila pneumoniae DC9

Chromosomale DNA von Mykobakterienstämmen:

M. pinnipedii
M. fortuitum
M. marinum
M. caprae
M. avium ssp. paratuberculosis

Chromosomale DNA von Chlamydien-Spezies:

Chlamydia psittaci
Chlamydia suis
Chlamydia abortus
Chlamydia pecorum
Chlamydophila caviae
Chlamydophila pneumoniae
Chlamydophila trachomatis
Chlamydophila muridarum

Antiseren

BLV-Referenzserum, positiv für AGIDT und ELISA
BLV-Referenzserum, schwach positiv für ELISA
BLV-Referenzserum, negativ für AGIDT und ELISA
BLV-Referenzserum, 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
H1N1, H3N2, H1N2 vom Schwein
H1N1 vom Kaninchen
HVA-Hyperimmunserum
IPNV-Hyperimmunserum
KHV-Hyperimmunserum
Kontrollserum *M. mycoides SC*
Kontrollserum Rind
Kontrollserum Pferd
Kontrollserum Beschälseuche Pferd
SVCV-Hyperimmunserum
WBV-Hyperimmunserum

Antigene

Beschälseuche-Antigen (*Trypanosoma equiperdum*)

Nukleinsäurepräparationen

AIV-M-Standard-RNA
AIV RNA H5N1/Asia
AIV RNA H5-Stämme
AIV RNA H7-Stämme
BVDV-Standard-RNA
CSFV-Standard-RNA
Interne Kontroll-RNA/DNA
Koi-Herpesvirus (KHV)-RNA
pCV-2-Standard-DNA
Virus der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV)-DNA
Virus der Infektiösen hämatopoetischen Nekrose (IHNV)-RNA
Virus der Viralen hämorrhagischen Septikämie (VHSV)-RNA

Monoklonale Antikörper

Anti-ILT-Virus-MAK 25-5 (gJ)
Anti-ILT-Virus MAK 28-5 (gC)
Anti-ISAV (ISA/18B11)
Anti-KHV (KHV/10A9, KHV/11A4, KHV/13E10, KHV/17A9, KHV/20F10)
Anti-PTV (040/4B1)
Anti-SVCV (SVC/2B12, SVC/1C10)

10.6 REFERENZLABORATORIEN

Nationales Referenzlabor für Orbivirusdiagnostik

(L. Stitz)

Das Referenzlabor für Orbivirusdiagnostik überwacht im Rahmen der hoheitlichen Aufgaben für das BMELV die Export-/Import-Tierbewegungen von Equiden (Afrikanische Pferdepest, AHS), Wiederkäuern (Bluetongue, BT) und Wildtieren (Bluetongue und Epizootische Hämorrhagie). Hierbei werden

überwiegend serologische Untersuchungen in Abstimmung mit den EU-Referenzzentren (AHS Laboratory, Algete, Madrid, Spanien und BT Pirbright, U.K.) durchgeführt. Das Nationale Referenzlabor nimmt regelmäßig an den Inter-Labor-Expertenvergleichstests der EU teil und erfüllt die Anforderungen des Qualitätsmanagements. Die Ergebnisse des letzten durchgeführten Vergleichstestes aus dem Jahr 2004 wurden im Jahre 2005 bekannt gegeben und ergaben eine vollständige Übereinstimmung mit den EU-Referenzzentren.

Für die Kontrolle von Proben sowie für den Nachweis potentiell Orbivirus-kontaminierter Biomaterialien (z.B. Importware) wurden sensitive PCR- und nested-PCR-Protokolle u.a. nach den O.I.E.-Empfehlungen entwickelt. Der molekulare Orbivirusnachweis wurde experimentell validiert und wird in der Kontaminationsdiagnostik erfolgreich angewandt.

Nationales Referenzlabor für Ansteckende Schweinelähmung (Enterovirus-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 Enterovirus-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 nicht eitrigen Polioenzephalomyelitis, c) differentialdiagnostisch ist Schweinepest ausgeschlossen und d) Teschovirus 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 (mAk) 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-Antikörper sind vorrätig.

Das Referenzlabor verfügt für Dokumentations- und Vergleichszwecke über eine Sammlung von mehr als 250 PTV-Referenz- und Feldvirusstämmen und ist an deren laufender Aktualisierung interessiert. Eine Beobachtung der im Feld kursierenden Virustypen ist insofern von Bedeutung, als davon auszugehen ist, dass prinzipiell alle PTV-Serotypen neurotrop sein können und somit Potential zur Auslösung der Teschen-Talfan-Krankheit besitzen.

Die 2005 eingesandten Virusisolate stammten sämtlich von Hausschweinen unterschiedlichen Alters (darunter Läufer, Mastschweine) mit typischen ZNS-Störungen. Stets waren Einzeltiere oder kleine Gruppen von Tieren betroffen. Von zwölf eingesandten PTV-Proben wurden 5 x Serotyp 2, 1 x Serotyp 4 und 2 x Serotyp 13 festgestellt. In einem Falle lag eine Mischprobe vor, die PTV der Serotypen 1 und 3 enthielt, wahrscheinlich aber noch einen weiteren Serotyp. In drei Fällen konnte mit den zur Verfügung stehenden mAks der Serotyp nicht bestimmt werden. Hier könnten lediglich aufwändige Neutralisationstests unter Einbeziehung Isolat-spezifischer Immunsereen oder Sequenzierungen weiter helfen.

Für die Diagnosestellung und daraus resultierende praktische Konsequenzen ist die Serotypbestimmung relativ belanglos, im Allgemeinen ist die Feststellung „Porzines Teschovirus“ hinreichend.

Unter Verwendung der pan-PTV-spezifisch reagierenden mAks 040/4B1 und 156/1B9 wurden durch S.F.E. Scholes, VLA Lasswade, UK, immunhistochemische Untersuchungen an formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Material durchgeführt. Insbesondere mit dem 040/4B1 gelang erstmals die Markierung infizierter degenerierter Neuronen/Neuriten und neuronophagischer Knoten, einschließlich Phagozyten. Die Immunhistochemie könnte folglich geeignet sein als Ergänzung zu den virologischen Methoden.

Nationales Referenzlabor für Aujeszky'sche Krankheit

(T. Müller)

Die Aufgaben des nationalen Referenzlabors für Aujeszky'sche 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).

Im Jahr 2005 traten serologisch positive Reaktionen bei Überwachungsuntersuchungen zur Aufrechterhaltung eines von der AK freien Status in Bundesländern auf, die einen Vollvirusantikörper-ELISA verwendeten. Abklärungsuntersuchungen am FLI mittels Immunoblot zeigten, dass es sich dabei um unspezifische Reaktionen handelte.

Nationales Referenzlabor für Beschälseuche der Einhufer

(I. Moser)

Die Beschälseuche ist eine durch den einzelligen Parasiten *Trypanosoma equiperdum* verursachte Deckinfektion bei Einhufern. Sie wird zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen gezählt und ist 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. Der direkte Erregernachweis, auch mit molekularen Methoden, ist aufgrund des Krankheitsgeschehens wenig Erfolg versprechend. Das Referenzlabor unterstützt die Veterinäruntersuchungsämter bei der Abklärung von positiven oder fraglichen Fällen. Außerdem stellt das Referenzlabor für die Untersuchungsämter die für die KBR benötigten Reagenzien (Kontrollseren, Antigen) zur Verfügung. Das Antigen wird als Lyophilisat eines Referenzstammes im Referenzlabor hergestellt. Insgesamt wurden 72 lyophilisierte Antigen-, 36 positive und dreizehn negative Kontrollserum-Portionen an Veterinäruntersuchungsämter abgegeben. Das Referenzlabor hat mit gutem Erfolg an einem internationalen Ringversuch zur Validierung eines ELISA teilgenommen. Zur Verbesserung der Spezifität der Diagnostik wurden verschiedene Wege beschritten. Die Eignung eines Immunoblots zur Verbesserung der Diagnostik in fraglichen Fällen wird getestet. Außerdem wird parallel ein weiterer Trypanosomenstamm als Antigen geprüft. Diese Arbeiten sind noch nicht abgeschlossen.

OIE- und nationales Referenzlabor für Bovine Herpesviren vom Typ 1 (BHV-1)

(M. Beer)

Das Nationale Referenzlabor für BHV-1 ist seit Mai 2005 auch als offizielles internationales Referenzlabor für IBR/IPV des internationalen Tierseuchenamtes (O.I.E.) bestätigt worden. Demzufolge hat auch die Anzahl der Proben aus dem Ausland wie auch die Zahl der internationalen Anfragen zugenommen. Eine große Rolle spielten dabei die weitreichenden Erfahrungen im Referenzlabor mit Markerimpfung und Markerdiagnostik.

Aufgrund der verpflichtenden Untersuchung auf BHV-1- bzw. BHV-1-gE-Antikörper war das Probenaufkommen auch 2005 wieder auf einem hohem Niveau. Im Jahr 2005 wurden 2.081 Serum- und Plasmaproben sowie 360 Milchproben aus 109 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 49 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 eine neu entwickelte *real time* PCR, die eine direkte Differenzierung von Wildtypviren und gE-deletierten Impfstämmen erlaubt, routinemäßig eingesetzt. In 16 Fällen wurde zudem eine Charakterisierung von Virus-Isolaten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, der PCR, des Restriktionsenzymfragment-Längenpolymorphismus oder der Sequenzierung von Genomabschnitten durchgeführt.

Die Untersuchung von Seren sogenannter „Pseudoimpfinge“ (BHV-1-Antikörper-positiv und BHV-1-gE-Antikörper-negativ, jedoch keine Markerimpfung) mit Hilfe des neu entwickelten gE-blocking-ELISAs auf Basis des monoklonalen Antikörpers 4D7 zeigten, dass auch im Jahr 2005 keine auffälligen Reaktivi-

täten nachgewiesen werden konnten, die beispielsweise auf das Auftreten von gE-Mutanten hinweisen, die in der Lage sind, sich den kommerziellen Testsystemen zu entziehen.

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 Diagnostika-Hersteller verschickt. Neben diesen Referenzmaterialien wurden BHV-1-Standardstämme zur Verwendung im Neutralisationstest oder der PCR zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden mehr als 250 Referenzseren oder Virustämme abgegeben.

Im Rahmen der Zulassung und Chargenfreigabe von *In-vitro*-Diagnostika wurden insgesamt 21 verschiedene Testchargen (gE-blocking-ELSIAs, gB-blocking-ELISAs, indirekte ELISAs) geprüft. In einem Fall wurde die Chargen-Freigabe für einen BHV-1-ELISA nicht empfohlen.

Im Jahr 2005 wurde zudem der 3. Ringtest zur BHV-1-Serologie vom NRL durchgeführt. Mehr als 30 nationale Untersuchungsstellen sowie Laboratorien aus den Niederlanden (OIE Referenzlabor), Italien, Frankreich, Österreich, Schweden und der Schweiz haben an der Untersuchung von Serum wie auch Milchproben mittels ELISA und Neutralisationstest teilgenommen.

Nationales Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease

(H. Schirrneier)

Die Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD) ist seit November 2004 anzeigepflichtig. Bereits vier Monate zuvor wurde das FLI mit der Wahrnehmung der Aufgabe eines NRL, welches inzwischen nach ISO/IEC 170 akkreditiert ist, beauftragt. Im TSN sind für das Jahr 2005 918 Fälle von BVD/MD ausgewiesen, was ein zwingender Hinweis darauf ist, dass der Pflicht zur Anzeige nur sehr ungenügend entsprochen wird. Kernstück einer Bundesverordnung, deren Diskussion jedoch 2005 nicht wie vorgesehen zu einem Abschluss gebracht werden konnte, ist eine Untersuchungspflicht für alle Zucht- und Nutztierhalter auf BVD-Virus bzw. -Virusgenom. Die Identifizierung und nachfolgende Eliminierung von persistent virämischen Tieren führt zu einer Senkung der Virämikerkzahl und zur Zertifizierung BVDV-unverdächtiger Rinder und Rinderbestände als das ausgewiesene Ziel eines bundeseinheitlichen Bekämpfungsprogramms. Dementsprechend richten sich die aktuellen diagnostischen Bemühungen und Entwicklungen in erster Linie auf verbesserte Methoden zum Virus- und Genomnachweis. So wurden 2005 erstmalig industriell hergestellte Testkits für den Nachweis von BVDV mittels RT *real time* PCR im Rahmen des Zulassungsverfahrens geprüft und zur Anwendung empfohlen. Von den insgesamt 24 durchgeführten Zulassungs- bzw. Chargenprüfungen für ELISA-Testkits entfielen 18 auf Tests zum Antigen-nachweis. In einem Fall konnte die Neuzulassung eines ELISA nicht empfohlen werden, alle anderen Prüfungen spiegelten eine gute und reproduzierbare Qualität der auf dem Markt vorhandenen Tests wider. Das für die Prüfung verwendete Probenpanel wurde erweitert und Standards, die auch den Untersuchungsämtern zur Verfügung stehen, für die Serologie beider Genotypen des BVDV eingeführt.

Im Rahmen der Wahrnehmung hoheitlicher Aufgaben und der diagnostischen Amtshilfe wurden 201 Serum- bzw. Plasmaproben auf BVDV und/oder BVDV-Antikörper untersucht, zweimal gelangten Spermaproben zur Untersuchung. Außerdem wurden 138 Serumproben von Wildwiederkäuern auf Antikörper gegen verschiedene Pestiviruspezies bzw. Genotypen geprüft (neben OHV2). Von zwölf phänotypisch und genotypisch charakterisierten BVDV-Zellkulturisolaten gehörten elf zum Genotyp 1 und ließen sich nach ihrer 5' NTR-Sequenz vier verschiedenen Subtypen zuordnen.

Die Sammlung von Methoden zur Diagnose anzeigepflichtiger Tierseuchen – einsehbar im TSN – wurde durch einen Abschnitt BVD/MD erweitert, was einen weiteren Schritt zur Standardisierung der BVD-Diagnostik mit validierten Methoden darstellt.

Das NRL nahm an einem von der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) durchgeführten Ringversuch teil. Die Ergebnisse bestätigen die Kompetenz und Verlässlichkeit des Labors.

OIE- und nationales Referenzlabor für Enzootische Rinderleukose (EBL)

(D. Beier)

Im Berichtszeitraum konnte auf der Basis der Beschlüsse des OIE Referenzlabor-Meetings von 2004 in Wusterhausen die internationale Kooperation zwischen den OIE-Referenzlabors weiter intensiviert werden:

Im Vorwort zum „OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2004“ wird postuliert, weltweit für alle diagnostischen Untersuchungseinrichtungen einheitliche Standardmethoden zur Erkennung von Tierseuchen anzuwenden. Diese Zielstellung soll ein Höchstmaß an Vergleichbarkeit und Richtigkeit von Laborergebnissen gewährleisten, um einen zuverlässigen Überblick über die jeweilige nationale und internationale Seuchensituation zu ermöglichen.

Um dieser Forderung nachkommen zu können, sind sowohl an die Untersuchungseinrichtungen als auch an die Hersteller von Testreagenzien besondere Anforderungen zu stellen, die als internes und externes Qualitätsmanagement definiert werden. International einheitliche und/oder vergleichbare Labormethoden setzen aber den Einsatz von definierten Prüfstandards voraus. Zur Durchführung der qualitätsgerechten BLV Antikörperdiagnostik wurde die Bereitstellung eines neuen Prüfstandards in Form eines positiven Kontrollserums von den OIE Referenzlabors als dringendste Aufgabe bekräftigt. Mit Hilfe dieser Partner konnten in ausreichender Menge Einzelseren aus vier Ländern bereitgestellt werden, die durch unser Labor nach den Vorgaben des *OIE Quality Standard and Guidelines* geprüft und zum neuen Standardserum gepoolt wurden. Das neue designierte Referenzserum wurde national in einem Ringtest unter Teilnahme von 27 Untersuchungseinrichtungen und drei Testkit-Herstellern geprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen berechtigen zur Antragstellung an die OIE Standardkommission mit der Bitte um internationale Zulassung.

Auf nationale Ebene wurden im Berichtszeitraum insgesamt 502 Proben bearbeitet. Zum Einsatz kamen ausschließlich zugelassene kommerzielle Testsysteme zum BLV-Antikörpernachweis sowohl bei Blutserum (ELISA und AGIDT) als auch bei Milchproben (ELISA). Bei Einsendung von EDTA-Blut erfolgte in allen Fällen der BLV-Provirusnachweis mit Hilfe der PCR. Diese Untersuchungen dienten national der Abklärung unklarer Befunde in verschiedenen Untersuchungseinrichtungen. Zur Typisierung wurden alle positiven BLV-Provirus-*em*-Amplifikate einer RFLPA unterzogen.

Referenzproben (Blutserum und Milch) als Lyophilisate mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen sowie BLV-Provirus DNA wurden nach Anforderung nationalen und internationalen Untersuchungseinrichtungen zur Verfügung gestellt (Frankreich, Polen, Bulgarien, England, Schweden).

Die neue permanent BLV produzierende Zelllinie (PO 714) wurde von einem weiteren ELISA-Testkithersteller (IDEXX, Bommeli, Schweiz) als kontaminationsfreier Antigenproduzent erworben. Ringtests zur Evaluierung der Antikörper-Diagnostik erfolgten mit Probenmaterial aus Uppsala und Wusterhausen.

OIE- und nationales Referenzlabor für aviäre Influenza (AI)

(O. Werner)

Die sich von Südostasien nach Westen ausweitenden Geflügelpestausbüchre mit Viren des Subtyps H5N1 prägten 2005 die Tätigkeiten im Referenzlabor für AI. Insbesondere war die Bereitstellung von Referenzmaterialien und methodischen Hinweisen für die klassische und die molekulare Diagnostik von H5N1-Infektionen bei Geflügel aber auch beim Menschen ein zentrales Thema. Seit Mai 2005 ist das NRL AI zudem als OIE Referenzlabor anerkannt.

Basierend auf der Entscheidung 2005/464/EG wurden die Überwachungsuntersuchungen bei Wildvögeln und Geflügel fortgesetzt. Infolge der Eilverordnung zum Schutz vor der Geflügelpest, die eine Aufstallung des Hausgeflügels im Herbst 2005 erforderte, wurden Überwachungsuntersuchungen auch in Verantwortung der einzelnen Bundesländer durchgeführt. Die Auswertungen sind noch nicht abgeschlossen, jedoch lassen die Daten bereits erkennen, dass mehr als 5.000 Wildvogelproben virologisch und mehr als 20.000 Seren von Hausgeflügel serologisch untersucht wurden. Hinweise auf Hausgeflügelbestände mit Antikörpern gegen H5- oder H7-Subtypen wurden in lediglich drei Fällen gewonnen. Versuche zur Virusisolierung in den Beständen ergaben in einem Bestand den Nachweis eines H5N3-Virus niedriger Pathogenität; in den anderen Beständen konnten H5- bzw. H7-Subtypen virologisch nicht nachgewiesen werden. Umgebungsuntersuchungen ergaben keinen Anhaltspunkt für eine Verbreitung von AIV der Subtypen H5 bzw. H7 aus diesen Haltungen in Kontaktbestände. Die Untersuchung von Wildvögeln

mittels PCR führte zur Einsendung von 332 Probenmaterialien aus den Bundesländern. Etwa 75 % der Einsendungen konnten als Influenza-A-positiv bestätigt werden. Von ca. 15 % der bestätigt positiven Materialien konnten aviäre Influenzavirusisolate gewonnen werden. Dabei standen die Subtypen H3(N8), H6(N4) sowie H5(N2 und N3; niedrige Pathogenität) anteilmäßig im Vordergrund.

Ein nationaler Ringtest zur PCR und Virusisolierung wurde im Januar 2005 durchgeführt. Die Ergebnisse machten deutlich, dass eine weitere methodische Harmonisierung sowie die Einrichtung der RT *real-time* PCR in den Untersuchungseinrichtungen anzustreben ist. Das Referenzlabor selbst hat wieder erfolgreich am EU-Ringtest zur Diagnostik der aviären Influenza teilgenommen.

Im Rahmen der Beratungstätigkeit für das BMELV wurden zahlreiche Stellungnahmen zu Fragen der Seuchenvorbeugung und -bekämpfung, zu EU- und OIE-Dokumenten erarbeitet sowie an der Überarbeitung der Geflügelpest-VO und des Tierseuchenhandbuches mitgewirkt.

Nationales Referenzlabor für Fischkrankheiten

(D. Fichtner)

Das Nationale Referenzlaboratorium für Fischkrankheiten (NRL-F) hat 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 Hämato-poetische 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.

2005 wurden insgesamt 58 Organproben und Isolate (Zellkulturpassagen) von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) an das NRL-F zur Virusisolierung oder -identifizierung sowie zum Genomnachweis oder zur Genomanalyse eingesandt. Bei den isolierten und charakterisierten Viren handelte es sich um IHNV, VHSV, Virus der Sleeping Disease (SDV), Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV) und um Birnavirus II.

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 von insgesamt 40 VHSV- und IHNV-Isolaten durchgeführt, um die Herkunft von neuartigen Isolaten oder die Ursache von VHSV- und IHNV-Ausbrüchen zu ermitteln. Als Methode wurde die genetische Analyse der Virusisolate durch Sequenzierung ausgewählter Genombereiche eingesetzt. Insbesondere konnte bei zwei VHS-Fällen in der gleichen Region nachgewiesen werden, dass einmal eine Neueinschleppung vorlag, bei der anderen Teichwirtschaft wurde jedoch ein Virustyp gefunden, der schon in den Vorjahren nachweisbar und auch bei Wildfischen aufzufinden war. Hier kann davon ausgegangen werden, dass eine regionale Epizootie vorliegt. In einem weiteren Fall konnte gezeigt werden, dass unzureichende Desinfektionsmaßnahmen die Ursache für Neuausbrüche waren (P.-J. Enzmann).

In eingesandten Serumproben von Forellen wurden mittels ELISA Antikörper gegen VHSV und IPNV nachgewiesen.

Das KHV verursachte in den letzten Jahren verlustreiche Krankheitsgeschehen bei Kulturkarpfen (*Cyprinus carpio carpio*) und beim Koi (*Cyprinus carpio koi*). Die PCR zum Nachweis von KHV-Genom wurde optimiert und erwies sich als geeignete Methode zur Diagnose von KHV-Infektionen. Im letzten Jahr wurden 44 Organproben, Isolate (Zellkulturpassagen) und Nukleinsäure-Präparationen von Nutz- und Koi-Karpfen an das NRL eingesandt. In 21 dieser Proben konnte KHV-Genom nachgewiesen werden. Als Diagnostika zum Nachweis von KHV in Zellkulturen und in Organschnitten wurden ein Antiserum vom Kaninchen und monoklonale Antikörper (mAk, M. Dauber) hergestellt und für die Untersuchungsämter zur Verfügung gestellt.

Vom Europäischen Wels (*Silurus glanis*) wurde wieder ein Iridovirus isoliert, das als European sheatfish virus (ESV) bezeichnet wird und eng verwandt ist mit dem Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV). Die Methoden zum Nachweis dieser Iridoviren wurden am NRL-F etabliert.

Aus Aalen (*Anguilla anguilla*) wurden wieder das *Herpesvirus anguillae* (HVA), Erreger der so genannten „Rotkopfkrankheit“, das Eel Virus European X (EVEX) und Reoviren isoliert und identifiziert. Neu ist die Isolierung von Picornaviren aus Aalen, bei denen aber in den Organen auch HVA-Genom nachge-

wiesen werden konnte und die typische Symptome der Herpesvirus-Infektion zeigten. Die Pathogenität der Picornaviren für Aale muss noch geprüft werden.

Für den Besatz von Wildgewässern vorgesehene Lachse (*Salmo salar*) wurden mit negativem Ergebnis auf Virus und Virusgenom von ISA, IHN, VHS, IPN und SD getestet.

Zier- und verschiedene Wildfische wurden auf Virusinfektionen untersucht. Bei Fischen aus dem „Bachforellen (*Salmo trutta fario*) -Sterben in Bayern“ wurden umfangreiche virologische und immunologische Untersuchungen durchgeführt. Viren oder Genom relevanter Erreger konnten nicht nachgewiesen werden. Ein Isolat von einer Scholle (*Pleuronectes platessa*) erwies sich als Birnavirus II. Ein vom Barsch (*Percu fluviatilis*) isoliertes Virus konnte als Rhabdovirus, zugehörig zur Barsch-Rhabdovirus-Gruppe der aquatischen Vesikuloviren, identifiziert werden. Ein Isolat vom Blei (*Abramis brama*) wurde als White bream virus-like identifiziert, morphologisch ähnlich dem 2000 bei Routineuntersuchungen aus einer Güster (*Blicca bjoerkna*) isolierten neuartigen Virus. Ein weiteres Isolat vom Blei konnte in der elektronenmikroskopischen Untersuchung (H. Granzow) als Reovirus dargestellt werden. Im Rahmen der Risikoabschätzung beim Import von Zierfischen war die Untersuchung von drei verschiedenen Spezies auf EHNV-Genom negativ.

Gegenwärtig sind 35 Zelllinien an der „Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin“ verfügbar. 2005 wurde eine neue Karpfen-Lymphozyten-Linie in den Bestand aufgenommen (R. Riebe). MAk gegen KHV und ISAV wurden weiter charakterisiert und stehen für Forschung und Diagnostik zur Verfügung. Hergestellte mAk gegen Iridoviren (ESV und European Catfish Virus, ECV) und gegen das Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVC) werden noch auf Spezifität und Sensitivität getestet (M. Dauber).

Das NRL-F nahm wieder erfolgreich am jährlich stattfindenden Ringvergleich der nationalen Referenzlaboratorien der Mitgliedsstaaten der EU teil, der vom Gemeinschaftlichen Referenzlabor in Aarhus, Dänemark durchgeführt wurde.

Beim jährlichen Treffen der Vertreter der Nationalen Referenzlaboratorien für Fischkrankheiten aus den Mitgliedsstaaten 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 2001/98/EU) sowie aus dem Tierseuchengesetz ab.

Diagnostik

Klassische Schweinepest bei Hausschweinen ist 2005 nicht aufgetreten. Bei Wildschweinen wurde die Seuche Ende des Jahres in Nordrhein-Westfalen diagnostiziert.

Einen Überblick über die diagnostische Arbeit am Referenzlabor gibt folgende Auflistung:

Anzahl Einsendungen	2
Anzahl Erregernachweise	0
Anzahl Antikörpernachweise	14

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 KSP-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	7
Chargenfreigabe Antigen-ELISA	6

Chargenfreigabe CSF-Konjugat	1
Chargenfreigabe CSF-Vakzine	2

Nationales Referenzlabor für die Lungenseuche der Rinder

(M. Heller)

Die weltweite epidemiologische Situation bei der Lungenseuche der Rinder änderte sich 2005 im Vergleich zu den Vorjahren dahingehend, dass in einigen afrikanischen Staaten eine Zunahme bzw. Ausbreitung der Erkrankung zu verzeichnen war. Insbesondere in mehreren ostafrikanischen und südafrikanischen Ländern wie Tansania, Sambia und Botswana sind die wirtschaftlichen Verluste, hervorgerufen durch die Lungenseuche, weiter angestiegen. Die Situation hinsichtlich des Lungenseuchestatus in einigen Ländern Asiens ist unklar.

Europa ist nach wie vor Lungenseuche-frei, wenngleich durch den zunehmenden Tierhandel jederzeit Einschleppungsgefahr besteht.

Im Berichtszeitraum wurden keine Verdachtsproben oder sonstigen Proben zur Untersuchung auf Lungenseuche eingesandt.

Die Validierung der Immunoblottechnik für die Lungenseuchediagnostik wurde weitestgehend abgeschlossen. Es handelt sich dabei um ein weiteres serologisches Verfahren zur Lungenseuchediagnose, welches eine wesentlich höhere Spezifität und Sensitivität gegenüber der für den Tierhandel vorgeschriebenen Komplementbindungsreaktion aufweist. Das Verfahren soll im Referenzlabor zur Abklärung fraglicher oder unklarer positiver KBR-Ergebnisse eingesetzt werden. Man erhält auf diese Weise einen präziseren Befund hinsichtlich des Vorhandenseins von Antikörpern gegen den Lungenseucheerreger. Das Verfahren wird im OIE-Manual als zusätzliche serologische Methode zur Lungenseuche-Diagnostik empfohlen. Die Anwendung der Immunoblottechnik bleibt allerdings dem NRL vorbehalten.

Bei unseren Untersuchungen kamen eindeutig positive und negative Seren zum Einsatz. Eindeutig falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse traten nicht auf. Auch zwei Serumproben, die in der KBR falsch-positive Ergebnisse lieferten, konnten im Immunoblottest als negativ identifiziert werden.

Ein von der OIE zugelassenes Alternativverfahren zur KBR ist ein kommerziell verfügbarer Antikörper-ELISA, für den in Deutschland allerdings keine Zulassung vorliegt. Im Falle eines Lungenseuche-Ausbruches besteht allerdings die Möglichkeit, im Rahmen einer Sondergenehmigung diesen ELISA im NRL einzusetzen.

Unter der Leitung des NRL Lungenseuche wurde auch 2005 die Fortentwicklung des bundeseinheitlichen Tierseuchenbekämpfungshandbuchs (Unterarbeitsgruppe Lungenseuche) im Rahmen der Task Force Tierseuchenbekämpfung fortgeführt. Nunmehr steht der Entwurf des Handbuchs im Tierseuchennetzwerk zur Verfügung. Um auch zukünftig eine ausreichende Aktualität des Handbuchs zu gewährleisten, ist die regelmäßige Überarbeitung erforderlich.

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).

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.

Angesichts der heute im MKS-Ausbruchsfall geforderten Durchsätze bei serologischen Untersuchungen müssen Proben aus symptomfreien Beständen in den Untersuchungseinrichtungen der Länder untersucht werden. In Vorbereitung darauf wurde ein Ringtest durchgeführt. Hierzu bat das FLI über das BMELV die Obersten Landesbehörden um Benennung von Untersuchungseinrichtungen für die MKS-Serologie. Das FLI versandte an die benannten Teilnehmer Rinderseren, welche in unterschiedlicher Menge Antikörper gegen Serotyp-übergreifende Nichtstrukturproteine des MKSV enthielten und regte an, zur Bestimmung der Spezifität zusätzlich negative Seren von Klautieren aus dem normalen Probenanfall zu untersuchen. Es gingen Ergebnisse von 20 Laboratorien ein. Alle Teilnehmer haben die vom FLI versandten Seren in dem verwendeten Ceditest FMDV-NS richtig klassifiziert. Die mit 1.578 untersuchten Proben ermittelte Spezifität lag, weitgehend unabhängig von der Probenart (Serum, Plasma; Rind, Schaf, Ziege, Schwein), bei fast 99 %. Der Test ist somit spezifisch, stabil und gut reproduzierbar.

Nationales Referenzlabor für Milzbrand

(A. Raßbach)

Im Berichtszeitraum wurden acht Organproben auf *Bacillus (B.) anthracis* untersucht. Dabei wurden selektives Kulturmedium (Anthrax-Blutagar [Heipha, Deutschland]) und chromogene Kulturmedien (*Cereus-Ident-Agar* von Heipha oder BCM® *Bacillus cereus/Bacillus thuringiensis* plating medium von Biosynth AG, Schweiz) zur Abgrenzung von *B.-anthracis*-Stämmen von anderen Spezies der Gattung *Bacillus* eingesetzt.

Weiterhin erfolgte die Untersuchung der Proben mit verschiedenen Nested-PCR-Systemen.

Die PCR, welche als Zielregion ein chromosomales Gen hatte, ergab für fünf 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.

Im Referenzlabor wurde im Berichtszeitraum neben der Nested-PCR auch die *real time* PCR eingearbeitet.

OIE- und nationales Referenzlabor für Newcastle Disease (ND)

(O. Werner)

Aufgabe des Nationalen Referenzlabors für ND ist die spezifizizierte Bestätigung von Verdachtsdiagnosen sowie die Charakterisierung der Virulenzeigenschaften von Isolaten des aviären Paramyxovirus Typ-1 (APMV-1). Die Bestimmung der Virulenz kann häufig durch serologische Tests in Verbindung mit der Sequenzbestimmung der proteolytischen Spaltstelle des Fusionsproteins erfolgen. In Einzelfällen müssen jedoch intracerebrale Pathogenitätstest an Eintagsküken durchgeführt werden.

Im Jahre 2005 wurden von regionalen Untersuchungsämtern und ausländischen Einrichtungen 148 Proben von Geflügel und Vögeln zur Diagnostik eingesandt. Hier konnten insgesamt 66 als PMV-1 identifiziert werden. Neun erwiesen sich als lentogen und dem Vakzinestamm La Sota verwandt. Ein Isolat von einem Wildvogel, der von der arabischen Halbinsel stammte, erwies sich als velogen; ein weiteres Isolat aus einer Stockente (Herkunft: Ostseeküste) steht noch zur Charakterisierung an. Durch Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern konnten 55 Isolate als Taubentyp des APMV-1 eingestuft werden. Sie stammten überwiegend von Tauben, einige aber auch von anderen Vögeln und Ziergeflügel. Aus importierten Ziervögeln wurden während der Quarantäne in Deutschland ebenfalls Paramyxoviren isoliert: APMV-2 (n=7), APMV-3 (n=3), APMV-6 (n=1), APMV-7 (n=1).

Die Teilnahme an zwei europäischen Ringversuchen war erfolgreich.

Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose

(H. Köhler)

Am 17.01.2005 wurden vom BMELV die Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien) veröffentlicht. Sie sollen die Grundlage für eine Vereinheitlichung der Bekämpfungsstrategien in den einzelnen Bundesländern Deutschlands schaffen. Aus den Leit-

linien leitet sich die Aufgabe des NRL ab, alle zugelassenen Diagnostika auf ihre Eignung zum Einsatz für die flächendeckende Erfassung und Überwachung des Auftretens der Paratuberkulose zu überprüfen.

Das NRL nahm erfolgreich an einem internationalen Ringversuch zum kulturellen Nachweis von *Map* in Kot- und Organproben teil, der vom OIE Referenzlabor für Paratuberkulose am VRI, Brno, Tschechische Republik, organisiert wurde. Des Weiteren wurde eine deutschlandweite Laborvergleichsstudie abgeschlossen, die die Evaluierung eines Verfahrens zur Verkürzung des kulturellen Erregernachweises in Kotproben zum Inhalt hatte. Darüber hinaus wurde eine Studie zur Evaluierung von PCR-Systemen für den Nachweis von *Map* durchgeführt.

Im Jahr 2005 erfolgten sechs Chargenprüfungen für ELISAs. Es wurden Zulassungsverfahren für vier PCR-Kits zum Direktnachweis von *Map* in Kot- und Milchproben bearbeitet, von denen jedoch bisher keines erfolgreich abgeschlossen werden konnte.

Das NRL ist an einem EU-Projekt beteiligt, das eine verbesserte Diagnostik und Epidemiologie von Mykobakterieninfektionen zum Inhalt hat (Co-ordination Action SSPE-CT-2004-501903, VENoMYC). Im Jahre 2005 nahm das NRL Beratungstätigkeit in Arbeitsgruppen des Milchindustrieverbandes und des Deutschen Bauernverbandes zur Paratuberkulosedagnostik und -bekämpfung wahr.

Nationales Referenzlabor für Psittakose

(K. Sachse)

Das NRL Psittakose erhielt im Jahre 2005 insgesamt 127 Verdachtsproben auf aviäre Chlamydiose, d.h. Psittakose bzw. Ornithose. Darunter befanden sich zwölf Proben von erkrankten Patienten, von denen fünf positiv auf *Chlamydophila psittaci* getestet wurden. Die restlichen 115 Proben stammten von Geflügel und weiteren Vogelarten (davon 60 positive).

Ein beträchtlicher Teil des Probenmaterials wurde im Zusammenhang mit einem Ornithoseausbruch bei Geflügel in Sachsen-Anhalt und Thüringen im Juni 2005 eingesandt. In einem nicht behördlich genehmigten Geflügelbestand im Landkreis Sangerhausen war eine massive Chlamydieninfektion festgestellt worden, die mit einer *Mycoplasma-gallisepticum*-Infektion einherging. Das Geschehen hatte sich durch Tierhandel schließlich auf 77 Kontaktbestände in elf Landkreisen Sachsen-Anhalts und 27 Bestände in vier Kreisen Nordthüringens ausgebreitet. Insgesamt sieben Personen mit labordiagnostisch (serologisch) bestätigter Diagnose wurden zeitweilig stationär behandelt (Hauptsymptome Erkältung und Schnupfen). In weiteren elf Fällen wurde Ornithose entsprechend der klinisch-epidemiologischen Falldefinition festgestellt. Das NRL unterstützte die beiden zuständigen Landesuntersuchungsämter bei der Bestimmung der Spezies-Identität des Erregers und der Abklärung fraglicher Befunde, wobei vor allem die *real time* PCR und der DNA-Mikroarraytest (23S rRNA-Gen) eingesetzt wurden, in einigen Fällen noch zusätzlich nested *ompA* PCR und DNA-Sequenzierung. Von den 93 ans NRL eingesandten Proben erwiesen sich 45 als *Chlamydophila-psittaci*-positiv. In einer Reihe von Geflügelproben wie auch in der BAL und im Urin eines schwer erkrankten Tierarztes wurde an Hand der *ompA*-Sequenz sowie der DNA-Mikroarray-Testergebnisse der Stammtyp 6BC von *Chlamydophila psittaci* festgestellt. Interessanterweise konnte in drei Kontaktbetrieben ohne klinische Erkrankung von Geflügel oder Menschen zwar eine Infektion mit einem Bakterium der Gattung *Chlamydophila* nachgewiesen werden, die Daten der DNA-Sequenzierung und des Mikroarraytests zeigten jedoch keine hinreichende Homologie mit den etablierten Chlamydienpezies, so dass hier ein noch nicht taxonomisch definierter Keim vermutet werden muss. Nahezu zeitgleich, aber ohne offensichtlichen epidemiologischen Zusammenhang, kam es in einer benachbarten Region zur schweren Erkrankung eines Geflügelhalters mit serologischer und molekularbiologischer Bestätigung der *Chlamydophila-psittaci*-Infektion. Diese Erkrankungen zeigen das hohe zoonotische Potential aviärer Chlamydien und die Möglichkeit zur schnellen Ausbreitung der Infektion. Das Geschehen hat auch die Notwendigkeit einer schnellen, sensitiven und Spezies-spezifischen Chlamydiendiagnostik verdeutlicht.

Das zahlenmäßig höchste Probenaufkommen des Jahres stammte aus Rinderbeständen, da die Chlamydieninfektionen in einigen Regionen offensichtlich noch immer ein wichtiges Problem darstellen. Das NRL beteiligte sich mit diagnostischen Arbeiten an einer Prävalenzstudie mit 975 Kälbern aus 95 Beständen Nordrhein-Westfalens (Koordination: Landwirtschaftskammer NRW). Dabei wurden in 60,8 % der Bestände Chlamydien in Nasen- und/oder Augentupfern nachgewiesen. Bezogen auf alle untersuchten Tiere betrug die Chlamydienprävalenz 13,0 %. Ein direkter statistischer Zusammenhang zwischen Chlamydiennachweis und äußerlich sichtbaren respiratorischen Symptomen konnte zwar nicht gefunden werden, aber die Ergebnisse eines Forschungsprojekts am Standort Jena zeigten, dass bei natürlich infizierten, nicht symptomatischen Kälbern bestimmte Lungenfunktionsparameter gegenüber

Chlamydien-freien Kälbern beeinträchtigt sind. In jedem Falle sind die Chlamydien bei den Kälbern als wichtiges Reservoir für spätere Infektionen bei erwachsenen Tieren zu beachten.

Darüber hinaus beteiligte sich das NRL an einer weiteren Studie zu Chlamydieninfektionen in 15 Milchviehbeständen Nordrhein-Westfalens (Auftraggeber: Landesamt für Ernährungswirtschaft und Jagd NRW). Die Auswertung ist noch nicht abgeschlossen.

Diagnostisch-methodische Aktivitäten: Ein selbst entwickeltes Verfahren zum Chlamydiennachweis (Familie *Chlamydiaceae*) mittels 23S rRNA *real time* PCR wurde in die Routine überführt und steht somit den Landesuntersuchungsämtern zur Verfügung. Der DNA-Mikroarraytest wurde in einer gemeinsamen Validierungsstudie mit der Universität Zürich hinsichtlich seiner Eignung für die Routinediagnostik geprüft (Auswertung dauert noch an). Die Arbeiten auf methodischem Gebiet umfassten weiterhin die Prüfung einer kürzlich veröffentlichten *real time* PCR-Methode zum Nachweis von *Chlamydophila psittaci*. Allerdings musste die Sensitivität dieser SYBR-Green-Methode als unzureichend für klinische Proben eingeschätzt werden. In Zusammenarbeit mit dem Untersuchungsamt Stuttgart wurde inzwischen eine alternative *real time* PCR-Methode erarbeitet, die sich noch in der abschließenden Validierung befindet.

Nationales Referenzlabor für Rauschbrand

(F. Schulze)

Der Rauschbrand ist eine akute, infektiöse, aber nicht kontagiöse Gasödemkrankheit mit epizootischem Verlauf. Im Allgemeinen werden Jungrinder sowie gelegentlich Schafe und Ziegen infiziert. Der Erreger des Rauschbrandes ist *Clostridium (C.) chauvoei*. Der Keim muss von anderen Gasödemerregern, besonders *C. septicum*, dem Erreger des Pararauschbrandes, abgegrenzt werden. Letztes Jahr berichteten wir über die Einarbeitung eines PCR-Assays für die Differenzierung von *C. chauvoei* und *C. septicum*. Dieser Assay bildet eine Alternative zu den traditionellen mikrobiologischen Methoden. Nach der Amplifikation mit dem Primerpaar 16S UNI-L/R 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). Als Vergleichsmaterial dient die DNA der entsprechenden Typstämme.

Der Rauschbrand tritt nur in bestimmten Gebieten, so genannten Rauschbranddistrikten, auf. In der Bundesrepublik sind dies vor allem die Weser-Ems-Niederungen, Schleswig-Holstein und die Voralpenregion. Im Allgemeinen ist der Verlauf des Rauschbrandes durch sporadische Ausbrüche charakterisiert. Im Jahre 2005 kam es zu solch einem sporadischen Ausbruch in einem Landkreis des Bundeslandes Schleswig-Holstein (wir danken Herrn Dr. Sekulla vom Veterinäramt Schleswig-Flensburg für den Bericht). Von August bis November 2005 waren acht landwirtschaftliche Betriebe betroffen. Jungrinder im Alter von vier bis 27 Monaten zeigten unspezifische Lahmheit, Festliegen, eine Körpertemperatur bis 41,8 °C, Knistergeräusche beim Betasten des *Musculus gluteus* und eine schwere Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes. Die postmortale pathomorphologische und mikrobiologische Untersuchung ergab die Diagnose Rauschbrand. Insgesamt starben 36 Tiere. Die eingeleiteten Maßnahmen umfassten vor allem eine Veränderung des Managementsystems. Die Jungrinder wurden von den Weiden genommen und aufgestellt. Die Nutzung der betroffenen Weiden erfolgte nur durch ältere Rinder.

Im Berichtszeitraum wurden keine Isolate eingesandt.

Nationales Referenzlabor für Rotz

(M. Elschner)

Auf der Basis der Entscheidung 93/197/EWG der Kommission vom 05.02.1993 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen und die Beurkundung für die Einfuhr von registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden, sind für Equiden aus bestimmten Drittländern serologische Untersuchungen mittels KBR gefordert. Die Aufgabe des Referenzlabors umfasst insbesondere die Unterstützung der Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durch Abklärungsuntersuchungen bei positiven KBR-Befunden und die Zulassung bzw. Chargenprüfung von Diagnostika. Im Jahr 2005 wurden sieben Seren von Pferden sowie ein Serum vom Menschen auf Antikörper gegen *Burkholderia mallei* untersucht. Alle Proben wurden negativ befundet. Außerdem wurden zwei Chargenprüfungen für positives Kontrollserum für die

KBR durchgeführt. Das NRL nahm im Jahr 2005 an zwei internationalen Ringversuchen für die serologische Rotz-Diagnostik 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 allgemein gültige 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 Inaktivimpfstoffen gegen Salmonellen in bereits infizierten Beständen untersucht werden. Das NRL Salmonellose der Rinder hat darüber hinaus einen Artikel zur „Situation der Salmonellose der Rinder in der Bundesrepublik Deutschland in den Jahren 1995-2003 nach der Datenlage des Nationalen Tierseuchennachrichtensystems“ veröffentlicht (Methner, 2005, Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 118, 449-455).

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 2005 wurden insgesamt 21 Chargenprüfungen von Salmonellen-ELISA-Tests für die Tierarten Geflügel und insbesondere Schwein durchgeführt.

Nationales Referenzlabor für BSE/Scrapie

(M.H. Groschup)

Das INNT nimmt die Aufgaben des nationalen Referenzlabors für die BSE- und Scrapie-Diagnostik wahr. In dieser Funktion wurden im Jahr 2005 insgesamt 79 BSE- und 38 Scrapie-Verdachtsfälle mittels einer der in der EU zugelassenen OIE-Methoden (Immunoblot und/oder immunhistochemische Untersuchung) abgeklärt. Bei 32 Rindern und 31 Schafen bestätigte sich der BSE- bzw. Scrapie-Verdacht. Die seit 2002 diagnostizierten klassischen Scrapiefälle wurden gemäß den Vorgaben der EU-Verordnung 999/2001 mit den Methoden der Stammdifferenzierung untersucht. Dazu wurde am FLI ein Untersuchungsschema etabliert, das auf der biochemischen Analyse des krankhaften Prion-Proteins basiert. Dieses Verfahren wurde vom EU-Referenzlabor in Großbritannien evaluiert und zugelassen. Bei der mit Hilfe dieses Verfahrens durchgeführten retrospektiven Untersuchung aller seit 2002 aufgetretenen klassischen Scrapiefälle wurde kein Hinweis auf eine BSE-Infektion festgestellt. Neben diesen klassischen Scrapiefällen werden seit 2002 auch so genannte atypische Scrapiefälle diagnostiziert, die sich im anatomischen Verteilungsmuster im Gehirn sowie in den biochemischen Eigenschaften des abgelagerten pathologischen Prion-Proteins unterscheiden. Diese veränderten biochemischen Eigenschaften führen dazu, dass solche Fälle nur von wenigen der derzeit für die Untersuchung kleiner Wiederkäuer zugelassenen Schnelltests erkannt werden können. Diese atypischen Scrapiefälle machen mittlerweile mehr als 80 % der in Deutschland diagnostizierten Scrapiefälle aus. Obwohl deren Übertragbarkeit auf 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.

Darüber hinaus fungiert das FLI als Zulassungsstelle für die in Deutschland zur Anwendung kommenden BSE-Schnelltests. In dieser Funktion wurden im Jahr 2005 drei neue Schnelltests zugelassen, vier weitere

Zulassungsanträge werden bearbeitet. Im Rahmen der laufenden Chargenprüfung für die bereits zugelassenen Schnelltests wurden insgesamt 45 Chargen geprüft und zum Verkehr freigegeben.

Das Nationale Referenzlabor für BSE/Scrapie nahm 2005 wieder an Ringversuchen (Veterinary Laboratory Quality Assessment) des EU-Referenzlabors in Großbritannien, VLA, teil: es wurden drei Ringversuche zur histologischen BSE- und Scrapie-Untersuchung durchgeführt (davon zwei Versuche zur korrekten Beurteilung histologischer Präparate sowie ein Versuch zur korrekten Färbung und Beurteilung von Präparaten). Ein Ringversuch des EU-Referenzlabors überprüfte die ordnungsgemäße Durchführung der BSE-Schnelltestuntersuchungen (fünf BSE-Schnelltest-Präparate) im NRL. Zur histologischen Bewertung erhielt das INNT 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. Diese Schnitte wurden von den diagnostisch tätigen wissenschaftlichen Mitarbeitern des INNT unabhängig beurteilt und die Ergebnisse wurden an das VLA weitergeleitet. Zur immunhistologischen Färbung mit anschließender Beurteilung erhielt das INNT sechs Präparate (Rind und Schaf).

Vom VLA wurden ebenfalls Sets von je zehn Rinderhirnmazeraten zur Untersuchung mittels BSE-Schnelltests übersandt. Auch diese Ergebnisse (die Proben wurden mit drei verschiedenen Schnelltests untersucht) wurden dem VLA zugesandt. 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 Nationalen Referenzlabors für BSE/Scrapie im Jahr 2005 wieder ein Ringversuch mit allen an der TSE-Diagnostik beteiligten Schnelltestlabors (staatlich und privat) durchgeführt. Hierbei wurden an 36 Labors Probensets mit je acht Proben (verschiedene BSE-Verdünnungsstufen sowie negative Proben) versandt. Diese Sets enthielten vier negative und vier positive Proben.

Im Ergebnis erkannten 35 der 36 Labore auf Anhieb alle Proben korrekt. Die inkorrekten Ergebnisse im 36. Labor kamen vermutlich durch eine Vertauschung von Proben zustande und wurden vom Labor in einer Wiederholung selbst bemerkt. Die quantitativ unterschiedlich starke Erkennung der schwach-reagierenden Probe konnte durch Nachschulungen durch die Hersteller und (in begrenztem Umfang) durch das INNT verbessert werden. Die Ergebnisse des Ringtests belegen den hohen Stand der diagnostischen Qualität in nahezu allen Labors.

Des Weiteren veranstaltete das nationale Referenzlabor für BSE/Scrapie das 7. Treffen aller staatlichen und privaten TSE-Schnelltestlaboratorien in Göttingen. Im Rahmen dieser Fortbildungsveranstaltung konnten die ca. 70 Teilnehmer im Anschluss an den Vortragsteil ihre Erfahrungen bei der BSE- und Scrapie-Schnelltestung austauschen.

WHO Referenzzentrum für Tollwut; OIE- und nationales Referenzlabor für Tollwut (T. Müller)

Das NRL für Tollwut am FLI war 2005 in die *in vivo* und *post mortem* Diagnose der vier humanen Tollwutfälle in Deutschland eingebunden. Anfang 2005 starben drei von sechs Organempfängern einer Ende 2004 verstorbenen Organspenderin. Bei den Patienten waren Lungen, Niere-Pankreas und eine Niere transplantiert worden. Während die *in vivo* Diagnostik nur bei zwei Speichelproben positiv war, konnte die endgültige Diagnose nur *post mortem* gestellt werden. Die Viruscharakterisierung bestätigte das Vorliegen eines Tollwutvirusstammes aus Indien, mit dem sich die Organspenderin bei einem Aufenthalt in dem Land infiziert hatte. Die übrigen drei Transplantatempfänger (2 Corneae, 1 Leber) entwickelten keine Symptome von Tollwut und überlebten.

Das WHO Referenzzentrum für Tollwut des FLI arbeitete in 2005 im Rahmen eines WHO Projekt zur Entwicklung eines monoklonalen Antikörper (mAk)-Cocktails für die post-expositionelle Impfung beim Menschen mit. Im Rahmen dieses Projektes wurden die *In-vitro*-Testungen der fünf potentiellen anti-Tollwutglycoprotein-mAk Kandidaten (darunter mAk E559 des FLI) mit verschiedenen Lyssavirus-Genotypen und Tollwutvirusvarianten unterschiedlicher geographischer Herkunft abgeschlossen. Die E559 Escape-Mutante zeigte im Glycoprotein-Gen zwei Mutationen, die zu zwei Aminosäureaustauschen im Bereich der Binding-Site II führten. Nur einer der fünf potentiellen mAk konnte die E559 Escape-Mutante neutralisieren. Kombinationen von Minicocktails bestehend aus jeweils zwei mAk werden im Hamstermodell *in vivo* getestet. Das NRL am FLI wurde durch die WHO beauftragt, bis Ende 2005 ein technisches Dossier zu erstellen.

Das WHO Referenzzentrum für Tollwut des FLI war an der Organisation der 1. OIE/WHO/EU Tollwut in Europa Konferenz vom 15. bis 18. Juni 2005 in Kiew beteiligt.

Anfragen jeglicher Art zur Tollwut, auch solche aus dem Ausland, werden regelmäßig an das WHO-CC am FLI weitergeleitet. Das trifft auch auf labor diagnostische Untersuchungen für die Humanmedizin zu. Das Referenzlabor hat erfolgreich an einem internationalen Ringversuch zur serologischen Diagnostik von Hunde- und Katzenserum im Rahmen der Einreise in tollwutfreie Regionen teilgenommen.

Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Tuberkulose

(I. Moser)

Das NVRL für Tuberkulose hat die Aufgabe, im Rahmen der Überwachung der Tuberkulosefreiheit bei der Abklärung von Infektions- bzw. Krankheitsgeschehen, die im Zusammenhang mit dem Nachweis „säurefester Stäbchen“ stehen, durch weitergehende Differenzierung und Identifizierung des Erregers mitzuwirken. Die Erreger der Tuberkulose bei Mensch und Tier werden im *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTC) zusammengefasst, dem heute folgende Spezies zugeordnet werden: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti* und *M. pinnipedii*. Für *M. caprae*, früher *M. bovis* ssp. *caprae*, und *M. pinnipedii* (früher: *Mycobacterium* typ seal) wurde erst kürzlich der Vorschlag gemacht, sie in den Rang einer eigenen Spezies zu erheben.

Die Diagnostik erfordert ein komplexes Methodenspektrum. Die Zugehörigkeit zum MTC wird mittels PCR erfasst, die exakte Spezies dann mittels „Spoligotypisierung“ identifiziert, eine Methode, bei der in einer Kombination von PCR und DNS-DNS-Hybridisierung die „Direct Repeat-Region“ auf dem Mykobakterienchromosom analysiert wird. Eine weitere, komplexe molekulare Methode, die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) auf der Basis des IS6110, kann zur Abklärung epidemiologischer Zusammenhänge angewandt werden. Die Typisierung aufgrund von „variable number of tandem repeat (VNTR)“-Sequenzen, besitzt ein ebenso gutes diskriminatorisches Potenzial wie die RFLP, ist jedoch weniger aufwändig, da sie methodisch allein auf der PCR basiert.

Nicht zum Komplex der Tuberkulose-Erreger gehörende Mykobakterien (*M. avium* und andere atypische Mykobakterien) werden mittels spezifischer PCR-Reaktionen, DNS-Sequenzanalysen oder PCR-Restriktionsanalysen identifiziert.

Aus eingesandten Organproben werden die Erreger auf Spezialnährmedien angezüchtet (6-8 Wochen Kultivierungszeit bei *M. bovis*) und danach mittels der genannten molekularen Methoden untersucht. Die Kultivierungszeit kann durch den Einsatz flüssiger Nährmedien auf ca. zwei Wochen verkürzt werden. Um die dennoch relativ lange Zeit der Diagnosestellung abzukürzen, wird bei *M. bovis*-Verdacht beim Rind parallel zur Kultur, die noch immer als „Goldstandard“ und sicherste Nachweismethode gilt, die DNS des Erregers mittels PCR direkt aus Organproben nachgewiesen. Dazu wurde die PCR hinsichtlich ihrer Sensitivität optimiert. Der direkte Nachweis verkürzt den Prozess der Diagnosestellung von mehreren Wochen auf wenige Tage. Dieser vorläufige Befund muss jedoch in jedem Falle durch Anzüchtung des Erregers bestätigt werden.

Insgesamt wurden 264 Organproben auf Tuberkuloseerreger und 105 Bakterienisolate von verschiedenen Tierarten auf ihre Spezieszugehörigkeit untersucht. Die Proben stammten aus 40 Rindern von vier Tuberkulose-Ausbrüchen oder mit sonstigen tuberkuloseähnlichen Veränderungen, aus etwa 107 Schweinen, etwa 18 Hühnern/Tauben, einem Pferd, 25 Zoo- oder Heimtieren (Giraffe bis Kaiman) und 24 Wildtieren.

Nationales Referenzlabor für Vibrionenseuche der Rinder

(F. Schulze)

Die Vibrionenseuche der Rinder – heute als bovine genitale Campylobacteriose (bgC) bezeichnet – ist eine durch Infertilität, frühe embryonale Mortalität und Abort charakterisierte venerische Infektionskrankheit. Der Erreger ist *Campylobacter (C.) fetus* ssp. *venerealis*, ein Bakterium mit ausgeprägtem Tropismus für die Genitalschleimhaut des Rindes (enzootischer Abort). Infektionen mit *C. fetus* ssp. *fetus* müssen abgetrennt werden. Dieser Keim hat sein natürliches Erregerreservoir im Intestinaltrakt des Rindes, doch kann er ebenfalls Aborte verursachen (sporadischer Abort). Die unterschiedliche klinische Bedeutung dieser Subspezies erfordert deren exakte Identifizierung.

Gegenwärtig basiert die traditionelle Differenzierung zwischen den beiden Subspezies auf einem einzigen phänotypischen Test (Toleranz gegenüber 1 % Glycin). Im Jahre 2003 berichteten wir über einen PCR-Assay für die Identifizierung und Differenzierung der zwei *C.-fetus*-Subspezies. Dieser Assay wurde

ursprünglich von Hum et al. im Jahre 1997 beschrieben und in unserem Laboratorium eingearbeitet. Jedoch ist die Zuverlässigkeit dieser PCR angezweifelt worden. Daher begannen wir Untersuchungen zu dieser Frage. Zunächst überprüften wir den Wert von sieben Tests für die traditionelle Differenzierung von *C. fetus* (Empfindlichkeit gegen Glycin, Metronidazol, Cefoperazon, KMnO₄, basisches Fuchsin und Na-Selenitreduktion, Wachstum bei 42 °C). Danach wurden die Ergebnisse der phänotypischen Differenzierung und der PCR verglichen.

Insgesamt wurden 103 *C.-fetus*-Isolate, einschließlich der beiden Typenstämmen, untersucht. In Abhängigkeit von den Ergebnissen des Glycintoleranz-Testes konnten die Isolate in 81 *C. fetus* ssp. *venerealis* (intolerant) und 22 *C. fetus* ssp. *fetus* (tolerant) eingeteilt werden. Bei allen *C.-fetus*-ssp.-*venerealis*-Isolaten stimmten die Ergebnisse der Selenit-Reduktion sowie der Empfindlichkeit gegen Metronidazol und Cefoperazon vollständig mit den Ergebnissen des Glycintoleranz-Testes überein. 73 *C. fetus* ssp. *venerealis* wuchsen nicht bei 42 °C (Übereinstimmung 90,1 %), aber acht Isolate zeigten ein schwach sichtbares, flaches, dunkelgraues Wachstum. Bei den 22 *C.-fetus*-ssp.-*fetus*-Isolaten stimmten die zusätzlichen phänotypischen Tests nur teilweise mit den Ergebnissen des Glycintoleranz-Testes überein. Die Subspezies *fetus* zeigte eine relativ gute Übereinstimmung der Glycintoleranz mit der Selenit-Reduktion (81,8 %), Cefoperazon-Resistenz (86,4 %) und dem Wachstum bei 42 °C (81,8 %).

Beim Vergleich des Glycintoleranz-Testes mit der PCR stimmten die Ergebnisse bei den 103 *C.-fetus*-Isolaten vollständig überein. Wir schlussfolgern, dass gegenwärtig die traditionelle phänotypische Charakterisierung der *C.-fetus*-Subspezies unter streng kontrollierten Bedingungen unverzichtbar ist, aber die PCR eine wertvolle Methode zur Bestätigung der phänotypischen Ergebnisse bildet. Die Ergebnisse wurden zusammengefasst und zur Publikation eingereicht (Schulze, F., Bagon, A., Müller, W., Hotzel, H.: "Subspeciation of *Campylobacter fetus* by phenotypic differentiation and PCR", J. Clin. Microbiol.).

Im Jahre 2005 wurden dreizehn Einsendungen mit 30 Isolaten aus vier Institutionen untersucht. Die Untersuchungen mittels PCR ergaben 21 *C. fetus* ssp. *venerealis* und sieben *C. fetus* ssp. *fetus*. zwei Isolate gehörten nicht zur Spezies *C. fetus*. Es fand eine nationale Arbeitsberatung über die bgC statt, auf der Empfehlungen zur Diagnose und Prophylaxe erarbeitet wurden.

OIE- und 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. Seit Mitte des Jahres erfolgt auch die Identifizierung und Differenzierung von Isolaten aus humanmedizinischen Untersuchungseinrichtungen im NRL.

Im letzten Jahr wurden insgesamt 177 Blut-, Plasma- oder Serumproben zur Abklärung unklarer Befunde der Untersuchungslaboratorien in den Bundesländern an das NRL eingesandt. Im Einzelnen waren das 68 Proben vom Rind, 77 vom Schwein und 27 vom Schaf bzw. von der Ziege. Vier untersuchte Seren stammten vom Wildschwein und eins vom Pudu (südamerikanische Hirschart). Spezifische Brucella-Antikörper konnten in keinem Fall nachgewiesen werden. 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.

Im gleichen Zeitraum wurden von uns 99 Serumproben vom Schaf auf Antikörper gegen *B. ovis* untersucht und negativ befundet. Es handelt sich hierbei um Exportuntersuchungen, die wir nur in Einzelfällen von Untersuchungsämtern übernehmen, da die Methode dort wegen der geringen Fallzahlen nicht vorgehalten werden kann. Gleichzeitig stellt das NRL den anderen Laboren Antigen und Kontrollseren zur *B. ovis*-Serologie zur Verfügung. Dies gilt auch für die *B. canis*-Diagnostik, die außerdem kommerziell angeboten wird. In fünf Fällen wurde die Untersuchung auf *B. canis*-Antikörper im NRL durchgeführt.

Seit Mitte des Jahres 2005 wurde auch die Brucellosediagnostik für den humanmedizinischen Sektor in Deutschland übernommen. Aus diesem Grund wurden im Berichtszeitraum elf Bakterienisolate von Humanpatienten zur Diagnose bzw. Differenzierung eingesendet. Davon erwiesen sich zehn als *Brucella melitensis*. Ein Isolat gehörte nicht zur Gattung *Brucella*. Zwei Einsendungen von Hase bzw. Wildschwein wurden als *Brucella suis* Biotyp 2 identifiziert.

Im Dezember 2006 nahm das NRL an einem europäischen Ringversuch des VLA Weybridge teil. Dabei wurden 24 Serumproben vom Rind mit einer Vielzahl von Methoden untersucht. Eine vergleichende Auswertung aus Großbritannien liegt noch nicht vor. Die Ergebnisse des Ringversuches „Serologische Diagnostik kleiner Wiederkäuer“ aus dem Jahr 2004 zeigten, dass die im Labor zur Diagnostik eingeführten Methoden den international angesetzten Maßstäben entsprechen.

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.

Im abgelaufenen Berichtsjahr gelangte Organmaterial (Lunge, Leber) sowie Nasentupfer eines Rinderfetusses zur Abklärung auf Befall mit *Tritrichomonas foetus*. Im Ausstrichpräparat konnten hierbei lebhaft bewegliche Flagellaten nachgewiesen werden. Weder die Trichomonaden-PCR noch die *T. foetus*-PCR ergaben einen Hinweis auf das Vorhandensein der Trichomonadenseuche. Auch ließen die Flagellaten sich in keinem der verfügbaren Medien weiterkultivieren, sodass die Verdachtsdiagnose sich nicht bestätigte.

Nationales Referenzlabor für Caprine Arthritis/Encephalitis und Maedi/Visna

(D. Beier)

Im Gegensatz zu M/V ist die CAE in der Bundesrepublik Deutschland nicht meldepflichtig, wird aber in einigen Territorien auf freiwilliger Basis oder auf Initiative von Ziegen-Zucht-Verbänden sowie in Länderhoheit bekämpft.

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.

Durch das OIE erhielt der Testkithersteller Fa. Pourquier, Frankreich, den Auftrag, ein international einsetzbares positives Referenzserum zur Diagnostik der MVV Infektion herzustellen. An dem durch die Fa. Pourquier initiierten internationalen Ringvergleich war auch unser Referenzlabor beteiligt.

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.

Nationales Referenzlabor für Muschelkrankheiten

(S.M. Bergmann)

Im Jahr 2005 wurden fünf Einsendungen von Pazifischen Austern (*Crassostrea gigas*) und Miesmuschel (*Mytilus edulis*) registriert. Die Einsender waren ein privates Labor und verschiedene Ämter aus dem Land Niedersachsen. Im Spätsommer traten ungewöhnlich hohe Mortalitäten bei Pazifischen Austern vor allem

im Bereich von Häfen auf. Histologisch waren degenerative Veränderungen an den Kiemen bei männlichen und weiblichen Tieren zu erkennen. Bei männlichen Tieren fiel eine Infiltration im Bindegewebe zwischen den Verdauungsdrüsen und den Geschlechtsorganen auf. Bei weiblichen Tieren standen die degenerativ-nekrotischen und infiltrativen Veränderungen der Eier im Vordergrund. Auffällig war, dass bei den Einsendungen im August noch etwa die Hälfte der Tiere weiblich war, im September/Okttober nur noch 1-2 von ca. 20 Tieren. Bei den Miesmuscheln zeigten sich geringgradige Degenerationen an den Kiemen und geringe Infiltrationen im Bindegewebe. Bei Versuchen zur Anzucht von Viren unter Verwendung von Fisch-Zellkulturen konnten bisher keine eindeutigen Hinweise auf die Isolierung von möglichen Erregern festgestellt werden.

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, Anaplas-mose 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 eine Erkrankung an FSME möglich. 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“. Vierzig Vorträge und 44 Poster gaben den 188 teilnehmenden Wissenschaftlern aus 21 Ländern Europas und den USA Gelegenheit, sich über zahlreiche aktuelle Themen im Bereich der durch Zecken übertragenen Erkrankungen auszutauschen. Dabei standen neben den ‚klassischen‘ Krankheiten Lyme Borreliose und FSME auch weitere, seltene, z.T. erst kürzlich erkannte Krankheiten im Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Der Erkenntniszuwachs seit IPS-VII 2003 auf den Gebieten allgemeine und spezielle Prophylaxe, Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik und Therapie im Zusammenhang mit diesen Zoonosen wurde sowohl für den human- als auch für den veterinärmedizinischen Bereich festgestellt und intensiv diskutiert. Die Öffnung des Meetings für Probleme, die sich durch andere Vektorarthropoden ergeben, hat das Meeting befruchtet und soll bei künftigen Veranstaltungen forciert werden. IPS VIII zeigte deutlich, dass die Einschätzung der WHO von 2004 zutrifft, dass die durch Vektoren übertragenen Krankheiten, insbesondere die durch Zecken übertragenen, in ihrer Bedeutung weiterhin zunehmen. Diese Risiken zu erkennen und zu minimieren war ein zentrales Anliegen von IPS VIII. Besonders erfreulich war, dass der Umzug des Symposiums von Berlin nach Jena und damit die erstmalige Durchführung des Symposiums nach der neuen Zuordnung des NRL im FLI in Jena dem Meeting gut getan hat. Die Proceedings des Meetings mit 58 Beiträgen befinden sich im Druck.

Das NRL-ZüK bietet folgende Leistungen an: Beratung 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).

<u>Referenzlaboratorien</u>	<u>Rechtsgrundlage</u>
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	VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 20.12.2005; BMELV-Auftrag
Bovine Herpesvirus 1-Infektionen	EU RL 93/42 in Verb. mit EU RL 95/109 und BHV-1-VO
Bovine Virusdiarrhoe	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	Entscheidung 93/197/EWG vom 05.02.1993 BMELV-Auftrag
Enzootische Rinderleukose (EBL)	EU RL 64/432 in Verb. mit EU RL 97/12 und Leukose-VO
Exotische Tierseuchen (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

<u>Referenzlaboratorien</u>	<u>Rechtsgrundlage</u>
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 Geschlechtskrankheiten der Rinder in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen

V. ORGANISIERTE VERANSTALTUNGEN

Conraths, F.J.: COST 854, Annual Conference, Warschau, Polen, 30.08.-02.09.2005

Conraths, F.J., Kramer, M.: Internationale Fachtagung „Validierung und praktische Einsetzbarkeit diagnostischer Testverfahren“, FLI und DVG-Fachgruppe „Epidemiologie und Dokumentation“, Wusterhausen, 07.-09.09.2005

Conraths, F.J.: WAAVP 2005 (Symposium Diagnosis and Control of Protozoan-Associated Abortion in Ruminants; Workshop Options for Control of Protozoan Abortions in Ruminants: Practical Experience), Christchurch, Neuseeland, 16.-20.10.2005

Fichtner, D., Bergmann, S.M., Fischer, U., Köllner, B., Enzmann, P.-J. und Kotterba, G.: X. Gemeinschaftstagung der Deutschen, der Österreichischen und der Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP) zum Thema Fischkrankheiten, Stralsund, 8.-10.09.2005

Haas, B. und Mettenleiter, T.C.: Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Greifswald-Insel Riems, 20.-23.09.2005

Heller, M. und Schubert, E.: Sitzungen der Arbeitsgruppe Lungenseuche zur Fortentwicklung des Tierseuchenbekämpfungshandbuchs im Rahmen der Task Force Tierseuchenbekämpfung, Gifhorn, 19.01.2005 und Oldenburg, 27.09.2005

Hoffmann, B.: Real-time-PCR-Workshop, Greifswald-Insel Riems, 30.11.2005

Institut für Virusdiagnostik zusammen mit dem AVID: 2. Riemser Diagnostiktage, 01. und 02.12.2005

Kramer, M. (Mitwirkung): Final Workshop on Monitoring of Classical Swine Fever in Wild Boar in Slovakia, Twinning Light Project between the Slovak Republic and Germany, 2003-004-995-01-04/0012/TL (Projektleiter: Dr. K.R. Depner), Kosice, Slowakische Republik, 06.-07.06.2005

Kramer, M. (Mitwirkung): Workshop “Animal disease eradication programs in Turkey and their implementation” – EU-Twinning-Project between Turkey and Germany in the Agricultural Sector – Support for the Alignment of Turkey with the EU Veterinary Acquis Twinning No. TR02/IB/AG-01, Ankara, Türkei, 27.-28.09.2005

Kramer, M., Staubach, C., Teske, K. und Kämer, D.: MKS-Simulationsübung für Amtstierärzte in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, dem Friedrich-Loeffler-Institut und dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, AKNZ Ahrweiler, 18.-20.01.2005

Kramer, M., Staubach, C., Teske, K. und Kämer, D.: 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 Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, AKNZ Ahrweiler, 18.-21.10.2005

Mettenleiter, T.C.: Symposium „Animal Disease Control in the 21st Century“, Greifswald-Insel Riems, 04.-06.04.2005

Micklich, A.: Schulung zum EDV-Projekt TRACES mit den Länderverantwortlichen in Bonn

Müller, T.: 1st OIE/WHO/EU Rabies in Europe Conference, Kiew, Ukraine, 15.-18.06.2005

- Reinhold, P.: 7. Workshop des Arbeitskreises "Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Berlin, 17.-18.03.2005
- Sachse, K.: 3rd Workshop of COST 855 "Diagnosis and Pathogenesis of Animal Chlamydioses", Siena, Italien, 22.-23.09.2005
- Sachse, K.: 3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Psittakose "Chlamydieninfektionen der Nutztiere – Diagnostik, Pathogenese und zoonotische Aspekte", Jena, 13.-14.10.2005
- Süss, J. und Klaus, C.: VIII. International Potsdam Symposium on Tick-Borne Diseases, Jena, 10.-12.03.2005

VI. WISSENSCHAFTLICHE ZUSAMMENARBEIT

Zusammenarbeit mit anderen Institutionen und Organisationen

Inland

Agrar- und Umweltanalytik GmbH/JenaGen GmbH, Jena
Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, Projektgruppe HI-Tier
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstökologie und Walderfassung, Eberswalde
Bundeswehr München, Institut für Mikrobiologie
Charité, Berlin
Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Clondiag Chip Technologies, Jena
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Pharmazeutisches Institut; Institut für Transfusionsmedizin
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; Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
Friedrich-Schiller-Universität Jena: Institut für Medizinische Mikrobiologie; Institut für Ernährungswissenschaften; Klinikum, Institut für Virologie
Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung, Jena
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Neuropathologie
Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, Roßlau
Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin
IVD GmbH, An-Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Geflügelkrankheiten; Institut für Parasitologie; Institut für Veterinär-Pathologie; Institut für Virologie
Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Landesamt für Ernährungswirtschaft und Jagd NRW, Düsseldorf
Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Rostock
Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten Nordrhein-Westfalen, Forschungsstelle für Jagdkunde und Wildschadenverhütung, Bonn
Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Dummerstorf
Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart
Landeskontrollverband Rheinland-Pfalz e.V., Bad Kreuznach
Landkreis Soest, Veterinärdienst
Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Münster
Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin; Institut für Geflügelkrankheiten
Max-von-Pettenkofer Institut, Genzentrum, LMU München
NABU Gebietsvereinigung West-Havelland
Niedersächsische Tierseuchenkasse, Hannover
Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Regierungspräsidium Stuttgart, Landesgesundheitsamt
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
Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Poing

Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz
Thüringer Tierseuchenkasse, Weimar
Tiergesundheitsdienst Thüringen e. V., Bad Langensalza
Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Mikrobiologie; Institut für Pathologie
Tiergarten Heidelberg
Tierpark Stralsund, Hansestadt Stralsund
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; Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Universität Konstanz, AG Umwelttoxikologie
Universität München, Sonderforschungsbereich Räumliche Statistik
Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Potsdam
Universität Rostock, Institut für Zellbiologie, Abt. Genetik; Institut für Bodenkunde, AG Agrobiotechnologie, Rostock
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 Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Ploufragan, Frankreich
Animal Health Trust, Newmarket, Großbritannien
Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), Department of Defense, Washington, D.C., USA
Biological Research Center, Szeged, Ungarn
Bundesamt für das Veterinärwesen, Bern, Schweiz
Bundesministerium für Soziale Sicherheit und Generationen der Republik Österreich
Central Veterinary Institute, Budapest, Ungarn
Central Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin, Irland
Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, Vereinigte Arabische Emirate
CISA-INIA, Valdeolmos, Spanien
CODA-CERVA, Department of Virology, Section Modelisation of Epizootic Diseases, Ukkel, Belgien
Colorado State University, USA
Columbia University, Infectious Disease Laboratory, New York, USA
CCS Haryana Agricultural University, Department of Veterinary Microbiology, Indien
Danish Institute for Food and Veterinary Research, Aarhus, Dänemark
Danish Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, Dänemark
Danish Veterinary Laboratory and Community Reference Laboratory for Fish Diseases, Aarhus, Dänemark
Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Teheran, Iran
Departamento de Patología, conZOOlting wildlife management, Barcelona, Spanien
DLO-Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad, 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
Forest Research Institute, Rotorua, Neuseeland
Fort Dodge Veterinaria SA Carretera Camprodon, Vall de Bianca, Spanien
Fujita Health University, Toyoake, Aichi, Japan
IGBMC, University Strasbourg, France
Institute for Animal Health, Compton, Großbritannien

Institut für klinische Veterinärmedizin, Charkow, Ukraine
 Institut für Virologie und Immunprophylaxe, Mittelhäusern, Schweiz
 Institute of Diagnostic and Animal Health, Bukarest, Rumänien
 Institute for Immunology, Biomedical Center, Uppsala, Schweden
 Institute for Veterinary Medical Products (IVMP), Department of Virology, Budapest, Ungarn
 Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo, Spanien
 Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Ozzano Emilia, Italien
 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italien
 International Research Centre, Pentlands Science Park, Edinburgh, Großbritannien
 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria,
 Alimentaria, Madrid, Spanien
 Ministry of Agriculture, Forestry and Food of the Republic of Slovenia, Veterinary Administration of the
 Republic of Slovenia, 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, Pentlands Science Park, Edinburgh, Großbritannien
 National Diagnostic and Research Veterinary Institute, Sofia, Bulgarien
 National Research Institute of Aquaculture, Tamaki, Mie, Japan
 National Veterinary Institute, Department of Virology, Uppsala, Schweden
 National Veterinary and Food Research Institute (EELA), Helsinki, Finnland
 National Veterinary Laboratory Vilnius, Litauen
 Nihon University, Kameino, Fujisawa, Kanagawa, Japan
 Norwegian School of Veterinary Science, Oslo, Norwegen
 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
 Otago University, Virus Research Unit, Department of Microbiology, New Zealand
 Parc Zoologique et Botanique de Mulhouse, Mulhouse, Frankreich
 PIWET, Pulawy, Polen
 Quantitative Veterinary Epidemiology Group (QVE), Animal Sciences Group, Wageningen UR, Division
 of Infectious Diseases, Niederlande
 Royal Veterinary & Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark
 Scarab Genomics, Madison, USA
 Scottish Fish Immunology Research Centre, Aberdeen, Großbritannien
 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
 SVANOVA Biotech AB, Uppsala, Schweden
 The Hebrew University – Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel
 Tufts University, School of Veterinary Medicine, MA, USA
 Turku Centre for Biotechnology, Turku, Finland
 Universidad Autónoma, Centro de Biología Molecular, Madrid, Spanien
 Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Dpto. Sanidad Animal, Madrid, Spanien
 Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Murcia, Spanien
 Universidade de Sao Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária, Sao Paulo, Brasilien
 Universität Bern, Institut für Veterinärbakteriologie; Institut für Veterinärvirologie, Bern, Schweiz
 Universitätsklinik Innsbruck, Österreich
 Universität Innsbruck, Institut für Hygiene und Sozialmedizin, Österreich
 University College Dublin, Faculty of Veterinary Medicine, Dublin, Irland
 University of Belgrade, Belgrad, Serbien
 University of Bergen, Norwegen
 University of Bologna, Section of Microbiology, Bologna, Italien
 University of Gdansk, Biotechnology, Dep. Molecular Virology, Gdansk, Polen

University of Ghent, Dept. of Molecular Biotechnology, Gent, Belgien
University of Illinois, Department of Pathobiology, Illinois, USA
University of Liège, Faculty of Veterinary Medicine, Lüttich, Belgien
University of London, The Royal Veterinary College, London, Großbritannien
University of Namur, Belgien
University of North Carolina, College of Veterinary Medicine, Raleigh, USA
University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
University of Stirling, Institute of Aquaculture, Stirling, Schottland, Großbritannien
University of Tromsø, Norwegen
University of Wisconsin, Madison, USA
Universität Zürich, Institut für Veterinärpathologie, Zürich, Schweiz
Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich
Veterinary and Agrochemical Research Centre (CODA), Brüssel, Belgien
Veterinary Laboratories Agency, Lasswade, Penicuik, Midlothian, Großbritannien
Veterinary Laboratories Agency (Weybridge), New Haw, Addlestone, Surrey, Großbritannien
Veterinary Research Institute, Brno, Tschechische Republik
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, Nationale Fischuntersuchungsstelle, 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. Vorlesung: „Angewandte Infektionsepidemiologie“; Gastvorlesung an der Universität Potsdam. – Dr. L. **Geue**, Gastvorlesung an der Universität Leipzig. – Dr. H. **Granzow**, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Vorlesung: „Allgemeine Virologie“ – Dr. V. **Kaden**, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin. Vorlesung: „Allgemeine und Spezielle Virologie“; Universität Rostock. Vorlesung: „Impfstoffe“. – 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. – PD Dr. G. **Meyers**, Privatdozent 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 Freien Universität Berlin und der Universität Potsdam. – Prof. Dr. E. **Pfaff**, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Vorlesung: „Einführung in die Virologie“ und „Aktuelle Probleme der Virologie“ sowie begleitende Praktika und Großpraktika. – PD Dr. O. **Planz**, Privatdozent an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Vorlesung: „Einführung in die Virologie“ und „Aktuelle Probleme der Virologie“ sowie begleitende Praktika und Großpraktika. – Dr. C.J. **Pötzsch**, Gastvorlesung an der Christian-Albrechts-Universität Kiel. – PD Dr. Dr. Petra **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“; Kiel-Kronshagen. Lehrgänge „Einführung in die Infektions-, Tropen- und Präventivmedizin für Sanitätsoffiziere (FSME, Borreliose und andere durch Zecken übertragene Krankheiten)“. – 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 Eberhard-Karls-Universität Tübingen und an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Vorlesung: „Einführung in die Virologie“ und „Aktuelle Probleme der Virologie“ sowie begleitende Praktika und Großpraktika. – Prof. Dr. J.P. **Teifke**, apl. Professor an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 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. R. **Ulrich**, Privatdozent an der Humboldt-Universität zu Berlin. Oberseminar für Studierende der Biologie (Diplom-Studiengang): „Virologie“; Kurs für Studierende der Medizin: „Mikrobiologie/Virologie“. – 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. – Dr. H. **Voigt**, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Vorlesung: „Einführung in die Virologie“ und „Aktuelle Probleme der Virologie“ sowie begleitende Praktika und Großpraktika.

Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Gremien

PD Dr. M. **Beer** ist Mitglied der EU-Arbeitsgruppe „IBR“, des EFSA-Expertengremiums „BHV-1“ sowie der Arbeitsgruppe „Molekulare Diagnostik“ des AVID. – Dr. S.M. **Bergmann** ist Schatzmeister der European Association of Fish Pathologists (EAFP). – PD Dr. F.J. **Conraths** ist 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. – 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. – 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 der Arbeitsgruppe „Geographic BSE Risk“ der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), Brüssel/Parma und Mitglied in der Arbeitsgruppe „GBR Up-date Methodology“ der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), Brüssel/Parma. – Prof. Dr. T.C. **Mettenleiter** ist 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, des wissenschaftlichen Beirats des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf, und der Akademie der Naturforscher „Leopoldina“. – Dr. U. **Methner** ist Mitglied des Scientific Panel on Biological Hazards on Vaccine for Salmonella at the European Food Safety Authority and of the Working Group on Risk Management Strategies for Salmonella spp. in broiler chickens of the Codex Committee on Food Hygiene. – Dr. Th. **Müller** war Mitglied des Steering and Scientific Committee der Rabies in Europe Conference 2005 in Kiew. – Dr. W. **Müller** ist Gutachter der AKS Hannover. – Dr. A. **Raßbach** ist Gutachterin der AKS Hannover. – 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 der ERS Task Force „Exhaled biomarkers“. – 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 Mycoplasmaology (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.) und Diplomate des American College of Veterinary Pathology (ACVP). – PD Dr. Dr. Th. W. **Vahlenkamp** ist Mitglied im Editorial Board „Veterinary Immunology and Immunopathology“ und „Clinical and Vaccine Immunology“ sowie Vorsitzender des feline Component innerhalb des Veterinary Immunology Committee (VIC).

Ämter in berufsständischen Organisationen

PD Dr. M. **Beer** ist Mitglied im Rat für Agrarwissenschaften sowie im Fachbeirat für Rinderzucht des Landes Mecklenburg-Vorpommern. – Dr. D. **Beier** ist Vizepräsidentin der Landestierärztekammer Brandenburg und Vorsitzende des Ausschusses für Weiterbildung in der Bundestierärztekammer und der Landestierärztekammer Brandenburg. – Dr. D. **Fichtner** ist stellvertretender Vorsitzender des Ausschusses für Fische der Bundestierärztekammer. – Dr. V. **Kaden** ist Mitglied des Ausschusses Tierseuchen in der Landestierärztekammer Mecklenburg-Vorpommern. – Dr. E. **Lange** ist Mitglied der Unfallkasse des Bundes Berlin, Fachgruppe Landwirtschaft. – Dr. H. **Schirmeier** ist Mitglied des Vorstandes des AVID sowie Mitglied im Fachbeirat für Schafzucht Mecklenburg-Vorpommern.

VII. VERÖFFENTLICHUNGEN

1 Veröffentlichungen des Friedrich-Loeffler-Instituts

1.1 Jahresbericht 2004 des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

1.2 Tiergesundheitsjahresbericht 2004 des Friedrich-Loeffler-Instituts, 5. Jahrgang, 2005

1.3 Rabies Bulletin Europe, Vol. 28, No. 3 und 4, 2004, Vol. 29, No. 1 und 2, 2005 Herausgeber: Pöttsch, C.J., Institut für Epidemiologie

2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

2.1 Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften

Alonso, M.C., I. Cano, E. Garcia-Rosado, D. Castro, J. Lamas, J.L. Barja, S.M. Bergmann und J.J. Borrego. 2005. Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus Solea bogaraveo* (Brünnich). J. Fish Dis. **28**:221-228.

Ankermann, T., A. Reisner, T. Wiemann, M. Krams, H. Köhler und M.F. Krause. 2005. Topical inhibition of nuclear factor- κ B enhances reduction in lung edema by surfactant in a piglet model of airway lavage. Crit. Care Med. **33**:1384-1391.

Ankermann, T., T. Wiemann, A. Reisner, M. Orłowska-Volk, H. Köhler und M.F. Krause. 2005. Topical interleukin-8 antibody attracts leukocytes in a piglet lavage model. Int. Care Med. **31**:272-280.

Azuma, T., J.M. Dijkstra, I. Kiryu, T. Sekiguchi, Y. Terada, K. Asahina, U. Fischer und M. Ototake. 2005. Growth and behavioral traits in Donaldson Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) cosegregate with classical major histocompatibility complex (MHC) Class I genotype. Behav. Gen. **35**:463-478.

Bashiruddin, J.B., J. Frey, M.H. Königsson, K.E. Johansson, H. Hotzel, R. Diller, P. de Santis, A. Botelho, R.D. Ayling, R.A. Nicholas, F. Thiaucourt und K. Sachse. 2005. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. Vet. J. **169**:268-275.

Beier, D., R. Lohse und A. Bothur. 2005. Neue Wege zur effektiveren Tierseuchenbekämpfung durch Bündelung der Diagnostik am Beispiel der enzootischen Rinderleukose (ERL). Tierärztl. Umschau **60**:675-679.

Borel, N., K. Sachse, A. Raßbach, L. Bruckner, E. Vretou, E. Psarrou und A. Pospischil. 2005. Ovine enzootic abortion (OEA): antibody response in vaccinated sheep compared to naturally infected sheep. Vet. Res. Commun. **29** [Suppl. 1]:151-156.

Bourteele, S., K. Oesterle, S. Pleschka, G. Unterstab, C. Ehrhardt, T. Wolff, S. Ludwig und O. Planz. 2005. Constitutive activation of the transcription factor NF- κ B results in impaired Borna Disease virus replication. J. Virol. **79**:6043-6051.

Buschmann, A. und M.H. Groschup. 2005. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. J. Infect. Dis. **182**:934-942.

Buschmann, A. und M.H. Groschup. 2005. TSE eradication in small ruminants – quo vadis? Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **118**:365-370.

- Byrne, W., B. Markey, R. McCormack, J. Egan, H. Ball und K. Sachse.** 2005. Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. *Vet. Rec.* **156**:767-771.
- Conraths, F., O. Werner, U. Methner, L. Geue, F. Schulze, I. Hänel, K. Sachse, H. Hotzel, E. Schubert, F. Melzer und T.C. Mettenleiter.** 2005. Konventionelle und alternative Haltungssysteme für Geflügel – Infektionsmedizinische Gesichtspunkte. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**:186-204.
- Conraths, F.J., H. Köhler, O. Werner, M. Beer, K. Depner, L. Geue, V. Kaden, C. Staubach, C. Pötzsch, G. Schares und T.C. Mettenleiter.** 2005. The „Friedrich-Loeffler-Institut“: past, present and future of research in infectious diseases of animals. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**:354-364.
- Ehricht, R., P. Slickers, S. Goellner, H. Hotzel und K. Sachse.** 2005. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol. Cell Probes* 2005, Dec. 2 [epub ahead of print]
- Eisinger, D., H.H. Thulke, T. Selhorst und T. Müller.** 2005. Emergency vaccination of rabies under limited resources – combating or containing? *BMC Infect. Dis.* **5**:10.
- Elschner, M., H. Hotzel, J. Reetz, R. Diller und P. Otto.** 2005. Isolation, identification and characterization of group A rotavirus from a chicken: the inner capsid protein sequence shows only a distant phylogenetic relationship to most other avian group A rotaviruses. *J. Vet. Med. B* **52**:211-213.
- Elschner, M., C. Schrader, H. Hotzel, J. Prudlo, K. Sachse, W. Eichhorn, W. Herbst und P. Otto.** 2005. Isolation and molecular characterisation of equine rotaviruses from Germany. *Vet. Microbiol.* **105**:123-129.
- Encke, J., J. Findekle, J. Geib, E. Pfaff und W. Stremmel.** 2005. Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection. *Clin. Exper. Immunol.* **142**:362-369.
- Enzmann, P.J., G. Kurath, D. Fichtner und S. Bergmann.** 2005. Infectious hematopoietic necrosis virus: monophyletic origin of European isolates from North American Genogroup M. *Dis. Aquat. Org.* **66**:187-195.
- Fereidouni, S.R., M. Aghakhan, O. Werner, E. Starick und M.H. Bozorghmehrifard.** 2005. Isolation and identification of avian influenza viruses from migratory birds in Iran. *Vet. Rec.* **157**:526.
- Fernandez Garcia, A., Ph. Heindl, H. Voigt, M. Büttner, P. Butz, N. Tauber, B. Tauscher und E. Pfaff.** 2005. Dual nature of the infectious prion protein revealed by high pressure. *J. Biol. Chem.* **280**:9842-9847.
- Fetzer, C., B.A. Tews und G. Meyers.** 2005. The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E^{ms} represents an unusual type of membrane anchor. *J. Virol.* **79**:11901-11913.
- Fischer, U., J.M. Dijkstra, B. Köllner, I. Kiryu, E.O. Koppang, I. Hordvik, Y. Sawamoto und M. Ototake.** 2005. The ontogeny of MHC class I expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol.* **18**:49-60.
- Fuchs, W., H. Granzow, R. Klopffleisch, B.G. Klupp, D. Rosenkranz und T.C. Mettenleiter.** 2005. The UL7 gene of pseudorabies virus encodes a nonessential structural protein which is involved in virion formation and egress. *J. Virol.* **79**:11291-11299.
- Fuchs, W. und T.C. Mettenleiter.** 2005. The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product. *Virus Res.* **112**:108-114.

- Fuchs, W., D. Wiesner, J. Veits, J.P. Teifke und T.C. Mettenleiter.** 2005. *In vitro* and *in vivo* relevance of infectious laryngotracheitis virus gJ proteins that are expressed from spliced and nonspliced mRNAs. *J. Virol.* **79**:705-716.
- Gabriel, G., B. Dauber, T. Wolff, O. Planz, H.-D. Klenk und J. Stech.** 2005. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**:18590-18595.
- Gaede, W., R. Reiting, H. Schirmeier, K. Depner und M. Beer.** 2005. Nachweis und Spezies-spezifische Differenzierung von Pestiviren mit der real-time RT-PCR. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**:113-120.
- Geldmacher, A., D. Skrastina, G. Borisova, I. Petrovskis, D.H. Krüger, P. Pumpens und R. Ulrich.** 2005. A hantavirus nucleocapsid protein segment exposed on hepatitis B virus core particles is highly immunogenic in mice when applied without adjuvants or in the presence of pre-existing anti-core antibodies. *Vaccine* **23**:3973-3983.
- Geue, L., H. Köhler und F.J. Conraths.** 2005. Epidemiologie, Diagnostik und Bekämpfung der Paratuberkulose. *Tierärztl. Umschau* **60**:492-497.
- Granzow, H., B.G. Klupp und T.C. Mettenleiter.** 2005. Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labelling study. *J. Virol.* **79**:3200-3205.
- Gretzschel, A., A. Buschmann, M. Eiden, U. Ziegler, G. Lühken, G. Erhard und M.H. Groschup.** 2005. Strain typing of German TSE Field Cases in Small Ruminants by Biochemical Methods. *J. Vet. Med. B* **52**:55-63.
- Hammer, M., R. Klopffleisch, J.P. Teifke und C.V. Löhr.** 2005. Cavernous or capillary haemangioma in two unrelated guinea pigs. *Vet. Rec.* **157**:352-353.
- Hausmann, J., K. Baur, K.R. Engelhardt, T. Fischer, H.-J. Rziha und P. Staeheli.** 2005. Vaccine-induced protection against Borna disease in wild-type and perforin-deficient mice. *J. Gen. Virol.* **86**:399-403.
- Hausmann, J., A. Pagenstecher, K. Baur, K. Richter, H.-J. Rziha und P. Staeheli.** 2005. CD8 T cells require gamma interferon to clear Borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. *J. Virol.* **79**:13509-13518.
- Heindl, P., A. Fernandez Garcia, M. Büttner, H. Voigt, P. Butz, B. Tauscher und E. Pfaff.** 2005. Some physico-chemical parameters that influence proteinase K resistance and the infectivity of PrPSc after high pressure treatment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**:1223-1231.
- Henkel, M., O. Planz, T. Fischer, L. Stitz und H.J. Rziha.** 2005. Prevention of Virus Persistence and Protection against Immunopathology after Borna Disease Virus Infection of the Brain by a Novel Orf Virus Recombinant. *J. Virol.* **79**:314-325.
- Henning, K., K. Sachse, P. Kirschen, J. Böhmer, K. Strutzberg-Minder und E. Grossmann.** 2005. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Chlamydien-Antikörpern in Seren vom Schwein. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**:1-7.
- Henning, K. und H. Sager.** 2005. Zur Diagnostik der Trichomonaden-Seuche des Rindes. *Tierärztl. Umschau* **60**: 349-351.
- Hoeger, B., B. Hitzfeld, B. Köllner, D.R. Dietrich und M.R. van den Heuvel.** 2005. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aqua Toxicol.* **73**:79-90.

- Hoeger, B., B. Köllner, D.R. Dietrich und B. Hitzfeld.** 2005. Water-born diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aqua Toxicol.* **75**:53-64.
- Hoffmann, B., M. Beer, C. Schelp, H. Schirrmeier und K. Depner.** 2005. A „ready-to-use“ real-time RT-PCR system for the detection of the classical swine fever virus genome. *J. Virol. Methods* **130**:36-44.
- Hoffmann, B., M. Beer, H. Schütze und T. C. Mettenleiter.** 2005. Fish Rhabdoviruses: Molecular Epidemiology and Evolution (Review). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **292**:81-117.
- Horvath, I., J. Hunt, P.J. Barnes, K. Alving, A. Antczak, E. Baraldi, G. Becher, W.J. van Beurden, M. Corradi, R. Dekhuijzen, R.A. Dweik, T. Dwyer, R. Effros, S. Erzurum, B. Gaston, C. Gessner, A. Greening, L.P. Ho, J. Hohlfeld, Q. Jobsis, D. Laskowski, S. Loukides, D. Marlin, P. Montuschi, A.C. Olin, A.E. Redington, P. Reinhold, E.L. van Rensen, I. Rubinstein, P. Silkoff, K. Toren, G. Vass, C. Vogelver, H. Wirtz; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate.** 2005. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Europ. Resp. J.* **26**:523-548.
- Hotzel, H., S. Blahak, R. Diller und K. Sachse.** 2005. Evidence of infection in Tortoises by Chlamydia-like organisms that are genetically distinct from known chlamydiaceae species. *Vet. Res. Comm.* **29** [Suppl. 1]:71-80.
- Höhle, C., A. Karger, P. König, K. Giesow und G.M. Keil.** 2005. High-level expression of biologically active bovine alpha interferon by bovine herpesvirus 1 interferes only marginally with recombinant virus replication in vitro. *J. Gen. Virol.* **86**:2685-2695.
- Immerseel, F. van, U. Methner, I. Rychlik, B. Nagy, P. Velge, G. Martin, N. Foster, R. Ducatelle und P.A. Barrow.** 2005. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol. Infect.* **133**:959-978.
- Jenkins, M.C., R. Fetterer, G. Schares, C. Björkman, W. Wapenaar, M. McAllister und J.P. Dubey.** 2005. HPLC purification of recombinant NcGRA6 antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* **131**:227-234.
- Jesenska, A., M. Pavlova, M. Strouhal, R. Chaloupkova, I. Tesinska, M. Monincova, Z. Prokop, M. Bartos, I. Pavlik, I. Rychlik, P. Möbius, Y. Nagata und J. Damborsky.** 2005. Cloning, biochemical properties, and distribution of mycobacterial haloalkane dehalogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6736-6745.
- Kaden, V., I. Hänel, C. Renner und K. Gossger.** 2005. Oral immunisation of wild boar against classical swine fever in Baden-Württemberg: development of the seroprevalence based on the hunting bag. *Eur. J. Wildl. Res.* **51**:101-107.
- Kaden, V., M. Kramer, B. Kern, A. Hlinak, J. Teuffert, C. Staubach, L. Mewes, A. Hänel, Ch. Renner, J. Dedek, H. Kiupel, W. Bruer und J. Blicke.** 2005. Orale Immunisierung gegen Klassische Schweinepest beim Schwarzwild: Empfehlungen zur Diagnostik nach Einstellung der Impfung. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* **12**:266-271.
- Kaden, V., H. Steyer, J. Schnabel und C. Bruer.** 2005. Classical swine fever (CSF) in wild boar: the role of the transplacental infection in the perpetuation of CSF. *J. Vet. Med. B* **52**:161-164.
- Keil, G., C. Höhle, K. Giesow und P. König.** 2005. Engineering Glycoprotein B of Bovine Herpesvirus 1 to Function as Transporter for Secreted Proteins: a New Protein Expression Approach. *J. Virol.* **79**:791-799.
- Klempa, B., M. Stanko, M. Labuda, R. Ulrich, H. Meisel und D.H. Krüger.** 2005. Central European Dobrava hantavirus isolate from striped field mouse, *Apodemus agrarius*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2756-2763.

- Klopfleisch, R., C.A. Müller, U. Polster, J.P. Hildebrandt und J.P. Teifke.** 2005. Granulomatous inflammation of salt glands in ducklings (*Anas platyrhynchos*) associated with intralesional Gram-negative bacteria. *Avian Pathol.* **34**:233-237.
- Klupp, B.G., J. Altenschmidt, H. Granzow, W. Fuchs und T.C. Mettenleiter.** 2005. Identification and characterization of the pseudorabies virus UL43 protein. *Virology* **334**:224-233.
- Klupp, B., S. Böttcher, H. Granzow, M. Kopp und T.C. Mettenleiter.** 2005. Complex formation between the UL16 and UL21 tegument proteins of pseudorabies virus. *J. Virol.* **79**:1510-1522.
- Klupp, B.G., H. Granzow, A. Karger und T.C. Mettenleiter.** 2005. Identification, subviral localization and functional characterization of the pseudorabies virus UL17 protein. *J. Virol.* **79**:13442-13453.
- Klupp, B., H. Granzow, R. Klopfleisch, W. Fuchs, M. Kopp, M. Lenk und T.C. Mettenleiter.** 2005. Functional Analysis of the Pseudorabies Virus UL51 Protein. *J. Virol.* **79**:3831-3840.
- Klupp, B.G., E. Mundt und T.C. Mettenleiter.** 2005. Functional analysis of the pseudorabies virus UL51 protein. *J. Virol.* **79**:3831-3840.
- Köhler, H., F. Conraths und L. Geue.** 2005. Epidemiologie, Diagnostik und Bekämpfung der Paratuberkulose. *Tierärztl. Umschau* **60**:492-497.
- Koppers-Lalic, D., E. Reits, M. Rensing, A. Lipinska, R. Abele, J. Koch, M. Rezende, P. Admiraal, D. van Leeuwen, K. Bienkowska-Szewczyk, T.C. Mettenleiter, F. Rijsewijk, R. Tampe, J. Neeffjes und E. Wiertz.** 2005. Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:5144-5149.
- Kraus, A.A., C. Priemer, H. Heider, D.H. Krüger und R. Ulrich.** 2005. Inactivation of Hantaan Virus-containing samples for subsequent investigations outside biosafety level 3 facilities. *Intervirology* **48**:255-261.
- Krause, M.F., T. Wiemann, A. Reisner, M. Orłowska-Volk, H. Köhler und T. Ankermann.** 2005. Surfactant reduces extravascular lung water and invasion of polymorphonuclear leukocytes into the lung in a piglet model of airway lavage. *Pulmon. Pharmacol. Therapeut.* **18**:129-139.
- Krout, K., T.C. Mettenleiter, V. Karpitskiy, X. van Nguyen und A. Loewy.** 2005. CNS neurons with links to both mood-related cortex and sympathetic nervous system. *Brain Res.* **1050**:199-202.
- Kunze, U., U. Baumhackl, R. Bretschneider, V. Chmelik, B. Grubeck-Lobenstein, M. Haglund, F. Heinz, R. Kaiser, P. Kimmig, C. Kunz, M. Kunze, A. Mickiene, L. Misic-Majerus, S. Randolph, B. Rieke, P. Stefanoff, J. Süß und R. Wimmer.** 2005. International Scientific Working Group on Tick-borne encephalitis: The Golden Agers and Tick-borne encephalitis. Conference report and position paper of the International Scientific Working Group on Tick-borne encephalitis. *Wien. Med. Wochenschr.* **155**:289-294.
- Laturnus, C., J. Jones, I. Moser, P. Schwerk und L. Wieler.** 2005. Long-term clonal lineages within *Campylobacter jejuni* O: 2 strains from different geographical regions and hosts. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**:521-524.
- Lawnick, U., P. Reinhold und K. Doll.** 2005. Therapeutischer Effekt einer Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung bei Kälbern mit Bronchopneumonie. (The therapeutic effect of inhalation of hypertonic saline solution in calves with bronchopneumonia). *Tierärztl. Prax.* **33**:373-382.
- Löhr, C., C. Juan-Salles, A. Rosas-Rosas, A.P. Garcia, M.M. Garner und J.P. Teifke.** 2005. Sarcoids in captive zebras (*Equus burchellii*): association with bovine papilloma virus type 1 infection. *J. Zoo Wildl. Med.* **36**:74-81.

- Methner, U.** 2005. Situation of bovine salmonellosis in Germany from 1995-2003 according to the data from the National Animal Disease Reporting System. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**:449-455.
- Monti, G.E., R. Schrijver und D. Beier.** 2005. Genetic diversity and spread of Bovine Leukemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Arch. Virol.* **150**:443-458.
- Moser, I.** 2005. Die Tuberkulose des Rindes in Deutschland: Geschichte, aktuelle Bedeutung und Diagnostik. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* **12**:116-121.
- Müller, T., J. Teuffert, C. Staubach, T. Selhorst und K.R. Depner.** 2005. Long-term studies on maternal immunity for Aujeszky's disease and classical swine fever in wild boar piglets. *J. Vet. Med. B* **52**:432-436.
- Novoa, R.R., G. Calderita, R. Arranz, J. Fontana, H. Granzow und C. Risco.** 2005. Virus factories. – Associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell* **97**:147-172.
- Nunziante, M., C. Kehler, E. Maas, M.U. Kassack, M. Groschup und H.M. Schätzl.** 2005. 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.
- Proding, W.M., A. Brandstätter, L. Naumann, M. Pacciarini, T. Kubica, M.L. Boschioli, A. Aranaz, G. Nagy, Z. Cvetnic, M. Ocepek, A. Skrypyk, W. Erler, S. Niemann, I. Pavlik und I. Moser.** 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4984-4992.
- Reinhold, P.** 2005. Modelle pulmonaler Infektionen bei Großtieren – speziesspezifische Unterschiede. *Pneumologie* **59**:412-417.
- Reinhold, P., U. Costabel, J. Hamacher, D. Theegarten und M. Rosenbruch.** 2005. Vergleichende Aspekte der broncho-alveolären Lavage bei Mensch und Tier. *Pneumologie* **59**:485-501.
- Reinhold, P. und P. Höchel.** 2005. Pathophysiologische Reaktionen des pulmonalen Kreislaufsystems auf Atemwegs- und Lungenerkrankungen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**:52-66.
- Reinhold, P., J. Jaeger, F. Melzer und K. Sachse.** 2005. Evaluation of lung function in pigs either experimentally or naturally infected with chlamydiae. *Vet. Res. Comm.* **29** [Suppl. 1]:125-150.
- Roth, B., R. Keleukou, A. Ike, R. Marschang, R. Boehm, A. Pfitzner, S. Omilabu und M. Elschner.** 2005. A new emerging human rotavirus is circulating in Nigeria causing severe diarrhea. *Emirates Med. J.* **23** [Suppl. 1]:1.
- Saalmüller, A., J.K. Lunney, C. Daubenberger, W. Davis, U. Fischer, T.W. Göbel, P. Griebel, E. Hollemwegger, T. Lasco, R. Meister, H.-J. Schuberth, K. Sestak, P. Sopp, F. Steinbach, W. Xiao-Wie und B. Aasted.** 2005. Summary of the animal homologue section of HLD8. *Cell Immunol.* **236**:51-58.
- Sachse, K., H. Hotzel, P. Slickers, T. Ellinger und R. Ehrlich.** 2005. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydia* spp. *Mol. Cell Probes* **41**:41-50.
- Sandmann, S., H. Meisel, A. Razanskiene, A. Wolbert, B. Pohl, D.H. Krüger, K. Sasnauskas und R. Ulrich.** 2005. Detection of human hantavirus infections in Lithuania. *Infection* **36**:66-72.
- Schaes, G., A. Bärwald und F. Conraths.** 2005. Adaption of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *J. Vet. Med. B* **52**:45-48.

- Schares, G., N. Pantchev, D. Barutzki, A.O. Heydorn, C. Bauer und F.J. Conraths.** 2005. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondii* in faeces collected from dogs in Germany. *Int. J. Parasitol.* **35**:1525-1537.
- Schmidt, J., B. Jandrig, B. Klempa, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, H. Meisel, M. Niedrig, C. Pitra, D.H. Krüger und R. Ulrich.** 2005. Nucleocapsid protein of cell culture-adapted Seoul virus strain 80-39: Analysis of its encoding sequence, expression in yeast and immunoreactivity. *Virus Genes* **30**:37-48.
- Schmidt, J., H. Meisel, B. Hjelle, D.H. Krüger und R. Ulrich.** 2005. Development and evaluation of serological assays for detection of human hantavirus infections caused by Sin Nombre virus. *J. Clin. Virol.* **33**:247-253.
- Schwardt, M., D. Mayer, R. Frank, U. Schneider, M. Eickmann, O. Planz, Th. Wolff und M. Schwemmler.** 2005. The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J. Gen. Virol.* **86**:3163-3169.
- Selhorst, T., T. Müller, H.P. Schwermer, M. Ziller und H. Schlüter.** 2005. Use of an Area Index to retrospectively analyze the elimination of fox rabies in European Countries. *Envir. Manag.* **35**:292-302.
- Smith, H.-J., P. Reinhold und M.D. Goldman.** 2005. Forced oscillation technique and impulse oscillometry. *Eur. Respir. Mon.* **31**:72-105.
- Starick, E., O. Werner und V. Kaden.** 2005. Labordiagnose der Aviären Influenza mittels reverser Transkription (RT)-PCR. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**:290-295.
- Süss, J.** 2005. Zunehmende Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Europa. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **130**:1397-1400.
- Süss, J.** Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe. *Phytophaga* **14**:625-642.
- Szeredi, L., H. Hotzel und K. Sachse.** 2005. High prevalence of Chlamydial (*Chlamydia psittaci*) infection in fetal membranes of aborted equine fetuses. *Vet. Res. Comm.* **29**:37-49.
- Teifke, J.P., E. Lange, R. Klopffleisch und V. Kaden.** 2005. Nictitating membrane as a potentially useful postmortem diagnostic specimen for classical swine fever. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**:341-345.
- Teifke, J.P., C.V. Löhr und C. Langner.** 2005. TP53 expressing squamous cell carcinoma of the tonsil in a captive polar wolf (*Canis lupus arctos*). *J. Zoo Wildl. Med.* **36**:538-542.
- Teuffert, J., T. Müller, M. Ziller und T. Selhorst.** 2005. Vorschlag zur Änderung der Stichprobenuntersuchung bezüglich der Kontrolle zur Aufrechterhaltung der Freiheit von der Aujeszky'schen Krankheit (AK). *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **112**:286-294.
- Teuffert, J., C. Pötzsch und K. Kroschewski.** 2005. Stand und Entwicklung der Bovinen Herpesvirus-Typ-1-Sanierung auf Bundes- und Länderebene. *Tierärztl. Umschau* **60**:469-479.
- Thebault, A., S. Bergmann, R. Pouillot, F. Le Roux und F.C. Berthe.** 2005. Validation of in situ hybridisation and histology assays for the detection of the oyster parasite *Marteilia refringens*. *Dis. Aquat. Org.* **65**:9-16.
- Theegarten, D., O. Anhenn, K. Sachse und P. Reinhold.** 2005. Nachweis von Chlamydiaceae in den Lungen von Pferden und Schweinen. *Pneumologie* **59**:831.
- Theegarten, D., H. Hotzel und K. Henning.** 2005. Comparison of different *Coxiella burnetii* isolates. *Infection* **33**:216.

Thiry, E., F. Meurens, B. Muylkens, M. McVoy, S. Gogev, J. Thiry, A. Vanderplasschen, A. Epstein, G.M. Keil und F. Schynts. 2005. Recombination in alphaherpesviruses. *Rev. Med. Virol.* **15**:89-103.

Thulke, H.H., T. Selhorst und T. Müller. 2005. Pseudorabies virus infection in wild boar: data visualisation as an aid to understanding disease dynamics. *Prev. Vet. Med.* **68**:35-48.

Trapp, S., J. von Einem, H. Hofmann, J. Kostler, J. Wild, R. Wagner, M. Beer und N. Osterrieder. 2005. Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *J. Virol.* **79**:5445-5454.

Unterstab, G., S. Ludwig, A. Anton, O. Planz, B. Dauber, D. Krappmann, G. Heins, Ch. Ehrhardt und Th. Wolff. 2005. Viral targeting of the interferon- β -inducing Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**:13640-13645.

Vahlenkamp, T.W. 2005. Die feline Immunschwächevirus (FIV)-Infektion – klinische Relevanz? *Tierärztl. Umschau* **60**:576-577.

Vahlenkamp, T.W., M.B. Tompkins und W.A. Tompkins. 2005. The role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in viral infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **108**:219-225.

von Felbert, I., W. Dreschel und J.P. Teifke. 2005. Regression eines infraorbitalen equinen Sarkoids nach Behandlung mit einem Präparat aus *Sanguinaria canadensis* – Ein Fallbericht. *Prakt. Tierarzt* **86**:330-334.

Walder, G., H. Hotzel, C. Brezinka, W. Gritsch, R. Tauber, R. Würzner und F. Ploner. 2005. An Unusual Cause of Sepsis during Pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **106**:1215-1217.

Wienhold, D., E. Armengol, A. Marquardt, C. Marquardt, H. Voigt, M. Büttner, A. Saalmüller und E. Pfaff. 2005. Immunomodulatory effect of plasmids co-expressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2-DNA vaccination. *Vet. Res.* **36**:571-587.

Windl, O., M. Buchholz, A. Neubauer, W. Schulz-Schaeffer, M. Groschup, S. Walter, S. Arendt, M. Neumann, A.K. Voss und H.A. Kretzschmar. 2005. Breaking an absolute species barrier: transgenic mice expressing the mink PrP gene are susceptible to transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* **79**:14971-14975.

Wolf, D., G. Schares, O. Cardenas, W. Huanca, A. Cordero, A. Bärwald, F. J. Conraths, M. Gauly, H. Zahner und C. Bauer. 2005. Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicunas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. *Vet. Parasitol.* **130**:81-87.

2.2 Kongressbeiträge und nicht referierte Veröffentlichungen

Antychowicz, J., M. Reichert, M. Matras, S.M. Bergmann und O. Haenen. 2005. Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of koi herpesvirus isolated in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **49**:367-373.

Beer, M. 2005. Aktuelle Grundsätze der Bekämpfung und Diagnostik der BHV-1-Infektion (5. Internationales Symposium zur BHV-1-, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung vom 09. bis 11. März 2005 in Stendal, Proceedings, S. 14-17)

Beer, M. 2005. BHV-1-Situation in Deutschland einschließlich Art. 9 der EU-Gesetzgebung (Leipziger Tierärztekongress 2005, Proceedings)

- Beer, M.** 2005. Moderne Tierseuchendiagnostik beim Rind (BPT-Kongress 2005, Proceedings, Band I, S. 97-98, 22.-25. September 2005)
- Conraths, F.J., L. Geue und H. Köhler.** 2005. Möglichkeiten der Paratuberkulose-Bekämpfung unter besonderer Berücksichtigung diagnostischer Probleme. (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Fachgruppe Tierseuchen, Tagungsband zur Tagung am 14.-15.09.2004, Hannover, S. 167-174).
- Cuff, T.L., C.M. Deaton, P. Reinhold, H.J. Smith und D.J. Marlin.** 2005. Resistance and reactance measured in horses and ponies using the Impulse Oscillometry System (IOS) (Abstract) (Proceedings of the World Equine Airway Symposium, Ithaca, NY, USA, July 20-22, 2005)
- Depner, K.** 2005. Bringen moderne diagnostische Verfahren und Impfstoffe eine Wende in der Bekämpfung der klassischen Schweinepest? (BPT-Kongress 2005, Proceedings, Band I, S. 42-47, 22.-25. September 2005)
- Depner, K., B. Hoffmann, M. Beer, J. Teuffert, V. Kaden, H. Schirmer, J. Blicke, J. Fritze und T.C. Mettenleiter.** 2005. Paradigmenwechsel in der Schweinepestbekämpfung bei Hausschweinen: ein auf Erregernachweis und Impfung gestütztes, erweitertes Tierseuchenbekämpfungskonzept. Dtsch. Tierärztebl. 4:398-401.
- Dobler, G., N. Frühwein, V. Hingst, P. Kimmig, U. Lindlbauer-Eisenach, F. von Sonnenburg und J. Süß.** 2005. Positionspapier zur FSME-Impfstrategie. Impfdialog 2:65-67.
- Enzmann, P.-J., D. Fichtner und S.M. Bergmann.** 2005. Infektiöse Haematopoetische Nekrose der Lachse: Die Einschleppung nach Europa als monophyletisches Ereignis. In: Gesunde Fische in der Aquakultur. X. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der EAAP zum Thema Fischkrankheiten; Hrsg. D. Fichtner, S.M. Bergmann, S. 41-44.
- Fichtner, D. und S.M. Bergmann.** 2005. Survey and Diagnosis of VHS, IHN and other fish diseases in Germany – Year 2004 data. In: E. Ariel: Surveillance Data of the NRLs 2004 (Documents of the 9th Annual Meeting of National Reference Laboratories for Fish Diseases, Part 3).
- Fichtner, D., S.M. Bergmann, P.-J. Enzmann, H. Granzow und M. Dauber.** 2005. Neues aus dem Nationalen Referenzlabor für Fischkrankheiten. In: Fichtner, D. und Bergmann, S.M. (Hrsg.): Gesunde Fische in der Aquakultur. X. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAAP), S. 25-40.
- Globig, A., E. Starick und O. Werner.** 2005. Untersuchung von Wildvögeln auf Aviäre Influenza und Paramyxoviren. (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Tagung der Fachgruppe „Geflügelkrankheiten“, 67. Fachgespräch, S. 73-82)
- Globig, A. E. Starick und O. Werner.** 2005. Surveillance of avian influenza viruses and paramyxoviruses in wild birds in Germany (14th World Veterinary Poultry Congress. 22.-26. August 2005, Istanbul/Turkey, S. 216)
- Globig, A., E. Starick und O. Werner.** 2005. The looming danger: avian influenza in wild birds (International Congress on Influenza, Berlin, Germany, May 2005, Tagungsband)
- Groschup, M.H.** 2005. Klassische und atypische Erscheinungsformen von Scrapie – Diagnostik und Übertragungsversuche. DGfZ-Schriftenreihe „Aktuelle Aspekte in der Schafzucht, TSE-Resistenzucht und Etablierung tiergenetischer Ressourcen“ 39:5-16.
- Groschup, M.H. und G. Erhardt.** 2005. Klassische und atypische Erscheinungsformen von Scrapie – Genetische Grundlagen. DGfZ-Schriftenreihe „Aktuelle Aspekte in der Schafzucht, TSE-Resistenzucht und Erhaltung tiergenetischer Ressourcen“ 39:17-23.

- Guntram, P., M. Vrijenhoek und E. Starick.** 2005. Experimental evidence for an autonomous pathogenicity of H9N2 avian influenza virus (14th World Veterinary Poultry Congress, 22.-26. August 2005, Istanbul/Turkey, S. 187)
- Hafner, A., B. Haas, H. Voigt, P. Calistri und M. Büttner.** 2005. Bedeutende Virusinfektionen mit Haut- und Schleimhautmanifestation beim Schaf. *Tierärztl. Praxis* **33**:209-218.
- Hautmann, W., S. Essbauer und R. Ulrich.** 2005. Gehäuftes Auftreten von klinisch apparenten Hantavirus-Infektionen in Niederbayern im Jahr 2004. *Epi. Bull.* **10**:84-85.
- Heller, M., E. Schubert und S. Thierbach.** 2005. Einsatz der Immunoblottechnik in der serologischen Lungenseuchediagnostik (24. Arbeits- und Fortbildungstagung der AVID – Bakteriologie, 14.-16. September 2005, Tagungsband).
- Henning, K., P. Reinhold, H. Hotzel und I. Moser.** 2005. Isolierung von Chlamydien aus Ratten eines Versuchstierbestandes (Abstract) (43. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde [GV-SOLAS], Berlin, 11.-14. September 2005, Tagungsband, S. 169)
- Hoffmann, B.** 2005. Real-time, multiplex PCR detection of African swine fever virus: A comparison of reagents. *QIAGENnews* **1**:16-17.
- Hoffmann, B., K. Depner, H. Schirrmeier und M. Beer.** 2005. BVD-Virus-Nachweis mittels real-time RT-PCR (5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung vom 09. bis 11. März 2005 in Stendal, Proceedings, S. 63)
- Immerseel, F. van, P.A. Barrow, P. Holt, U. Methner und R. Ducatelle.** 2005. Vaccinating to protect poultry early post-hatch and during moult. (World Poultry, *Salmonella* and *Campylobacter* special, S. 14-15).
- Kaden, V., M. Kramer, B. Kern, A. Hlinak, J. Teuffert, C. Staubach, L. Mewes, A. Hänel, C. Renner, J. Dedek, H. Kiupel, W. Bruer und J. Blicke.** 2005. Orale Immunisierung gegen Klassische Schweinepest beim Schwarzwild: Empfehlungen zur Diagnostik nach Einstellung der Impfung. *Amtstierärztl. Dienst u. Lebensmittelkont.* **12**:266-271.
- Jäger, J., R. Bachmann, F. Melzer, E. Schubert, K. Sachse und P. Reinhold.** 2005. Konsequenzen einer klinisch inapparenten Chlamydien-Infektion auf die Lungenfunktion von Schweinen und Kälbern (3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Psittakose, Jena, 13.-14. Oktober 2005, Tagungsband)
- Jäger, J., K. Sachse, F. Melzer und P. Reinhold.** 2005. Beeinflussung der Lungenfunktion durch Chlamydien (Abstract). *Pneumologie* **59** [Suppl. 1]:33.
- Jäger, J., E. Schubert, F. Melzer, K. Sachse und P. Reinhold.** 2005. Evaluation of lung function in pigs and calves naturally infected with Chlamydiaceae (Abstract) (3rd Workshop of COST-Action 855 “Diagnosis and Pathogenesis of Animal Chlamydioses”, Siena, Italy, 22.-23. September 2005, Bononia University Press, Bologna, Proceedings, S. 30-31)
- Kaden, V., M. Kramer, B. Kern, A. Hlinak, J. Teuffert, C. Staubach, L. Mewes, A. Hänel, Ch. Renner, J. Dedek, H. Kiupel, W. Bruer und J. Blicke.** 2005. Orale Immunisierung gegen Klassische Schweinepest beim Schwarzwild: Empfehlungen zur Diagnostik nach Einstellung der Impfung. *Amtstierärztl. Dienst u. Lebensmittelkont.* **12**:266-271.
- Köhler, H., B. Burkert, I. Pavlik, I. Moser, P. Möbius und G. Martin.** 2005. Validation of commercially available ELISA tests for the serodiagnosis of paratuberculosis in Germany (Abstract) (8th International Colloquium on Paratuberculosis in Copenhagen, Denmark, 14.-17. August 2005)

- Letzel, T., A.A. van Loon, E. Jagt und E. Mundt.** 2005. Beschreibung einer in Belgien isolierten antigenen Variante des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV). (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Tagung der Fachgruppe „Geflügelkrankheiten“, 67. Fachgespräch, S. 23-36)
- Lühken, G., A. Buschmann, M.H. Groschup und G. Erhardt.** 2005. Klassische und atypische Erscheinungsformen von Scrapie – Genetische Grundlagen. DGfZ-Schriftenreihe „Aktuelle Aspekte in der Schafzucht, TSE-Resistenz zucht und Erhaltung tiergenetischer Ressourcen“ **39**:17-23.
- Marlin, D.J., C.M. Deaton und P. Reinhold.** 2005. Collection, Analysis & Interpretation of Volatile Biomarkers in Exhaled Breath (Proceedings of the 23rd American College of Veterinary Internal Medicine [ACVIM], Baltimore, MD, USA, 1.-4. Juni 2005, S. 771-772)
- Melzer, F., R. Bachmann, M. Altrogge, D. Theegarten und P. Reinhold.** 2005. The detection rate of Chlamydiae in lung tissue and aorta of clinically inconspicuous slaughtering sows (Abstract) (3rd Workshop of COST-Action 855 „Diagnosis and Pathogenesis of Animal Chlamydioses“, Siena, Italy, 22.-23. September 2005, Bononia University Press, Bologna, Proceedings, S. 41-42)
- Melzer, F., R. Lohse, H. Nieper, M. Liebert und V. Kaden.** 2005. Serological investigations concerning Brucellosis in wild boars in Germany. (Brucellosis 2005, International Research Conference including the 58 Brucellosis research Conference, Merida, Yucatan, Mexico, October 2005, Proceedings, S. 55)
- Melzer, F., H. Tomaso und H. Neubauer.** 2005. Quality control of molecular tests and their recognition as validated diagnostics. (International Research Conference in Small Ruminants, Skopje, Macedonia, November 2005, Proceedings, S. 57)
- Methner, U.** 2005. Die Salmonellose der Rinder und ihr Potenzial als Zoonose (Symposium „Salmonellen bei Mensch und Tier“, Oberschleißheim, 01. Juni 2005, Tagungsband)
- Mettenleiter, Th. C.** 2005. Friedrich-Loeffler-Institut. Dtsch. Tierärztebl. 10/2005, S. 1134-1137.
- Mettenleiter, Th. C.** 2005. Veterinary Viruses. Nova Acta Leopold. NF 92, 344, S. 221-230.
- Mettenleiter, Th. C.** 2005. Neuer Name mit alter Tradition. Forschungsreport 1/2005, S. 42-43.
- Mettenleiter, Th. C.** 2005. Virusforschung auf der Insel Riems – Geschichte, Gegenwart und Zukunft des Friedrich-Loeffler-Instituts. bpt-Info 07/2005, S. 16-18.
- Mettenleiter, Th.C. und T. Vahlenkamp.** 2005. Tierseuchenexperten aus 20 Ländern bei Tagung des Friedrich-Loeffler-Instituts in Greifswald und auf der Insel Riems. DVG-Forum 2/2005, S. 24-25.
- Möbius, P., H. Hotzel, A. Raßbach und H. Köhler.** 2005. Vergleich verschiedener PCR-Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. (24. Arbeits- und Fortbildungstagung des AVID – Bakteriologie –, Kloster Banz, 14.-16. September 2005, Tagungsband)
- Möbius, P. und H. Köhler.** 2005. Results of a comparative study of PCR-systems to detect *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. (5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 9.-11. März 2005, Tagungsband)
- Möbius, P., G. Luyven, M. Bartos, I. Pavlik und H. Köhler.** 2005. New RFLP-Genotypes detected in bovine and ovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Germany (Abstract) (26th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Istanbul, Turkey, June 26-29, 2005)
- Möbius, P., G. Luyven und H. Köhler.** 2005. Molecular typing of MAP-isolates from cattle and sheep in Germany (Abstract) (8th International Colloquium on Paratuberculosis in Copenhagen, Denmark, 14.-17. August 2005)

- Moser, I.** 2005. Die Tuberkulose des Rindes in Deutschland: Geschichte, aktuelle Bedeutung und Diagnostik. *Amtstierärztl. Dienst* **II**:116-121
- Müller, J., E. Borrmann und M. Heller.** 2005. Cytokine-release of intestinal cell cultures during the co-culture with bacteria causing enteritis (Bio-Plex User Meeting, Basel, 6. Juli 2005, Tagungsband)
- Müller, J., F. Schulze, W. Müller und I. Hänel.** 2005. Untersuchungen zu Virulenz-assoziierten Genen in *Campylobacter-jejuni*-Isolaten mit unterschiedlichem Kolonisations- und Invasionsvermögen. (24. Arbeits- und Fortbildungstagung des AVID – Bakteriologie –, Kloster Banz, 14.-16. September 2005, Tagungsband, S. 16-17)
- Müller, T.** 2005. Tollwut – eine Gefahr von gestern? *Der Hund* **8**:12-14.
- Müller, T., T. Selhorst und C. Pötzsch.** 2005. Rabies in Germany – an update. *Eurosurveillance* (<http://www.eurosurveillance.org/em/v10n11/1011-228.asp>)
- Müller, W. und U. Methner.** 2005. Multiplex-PCR und *fla*-Typisierung zum Nachweis und zur Differenzierung von *Campylobacter-jejuni*- und *Campylobacter-coli*-Isolaten bei Legehennen. (24. Arbeits- und Fortbildungstagung des AVID – Bakteriologie –, Kloster Banz, 14.-16. September 2005, Tagungsband, S. 15-16)
- Pötzsch, C.J.** 2005. Was ist neu? Was ist anders? Erläuterungen zum geänderten Tierseuchengesetz und den entsprechenden Verordnungen, Geflügelpest-Verordnung. *Dtsch. Tierärztebl.* **53**:392-394.
- Rabsch, W., U. Methner, R. Reissbrodt und P.H. Williams.** 2005. Receptor proteins for catecholate siderophores are involved in virulence of *Salmonella enterica*. (7th International Symposium on Microbial Iron Transport, Storage and Metabolism, Paris, France, 1-4 June, 2005, Proceedings, S. 34)
- Reiche, R. und U. Methner.** 2005. Epidemiologie und molekulare Charakterisierung von *Salmonella-Paratyphi B d-Tartrat⁺* in Geflügelmastbeständen. (24. Arbeits- und Fortbildungstagung des AVID – Bakteriologie –, 14.-16. September 2005, Tagungsband, S. 12-13).
- Reichel, T., K. Sachse, E. Schubert, E. Liebler-Tenorio, C. Schröder, S. Reißig und P. Reinhold.** 2005. Etablierung eines Großtiermodells für respiratorische Infektionen mit Mykoplasmen (Abstract) (43. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde [GV-SOLAS], Berlin, 11.-14. September 2005, Tagungsband, S. 117)
- Reinhold, P.** 2005. Nicht-invasive Kontrolle der Lungenfunktion in kontrollierten Studien an wachen Schweinen (Abstract) (43. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde [GV-SOLAS], Berlin, 11.-14. September 2005, Tagungsband, S. 82)
- Reinhold, P., J. Jäger und C. Schröder.** 2005. The collection of exhaled breath condensate depends on various variables of ventilation. *Eur. Resp. J.* **26** [Suppl. 49] :261.
- Reinhold, P. A. Langenberg und K. Sachse.** 2005. Die respiratorische Impedanz bei experimentell mit *Chlamydia suis* infizierten Schweinen. *Atemw.-Lungenkrkh.* **31**:481-482.
- Reinhold, P., A. Langenberg und K. Sachse.** 2005. An experimentally induced infection with Chlamydiaceae results in airway inflammation, severe lung function disorders and oxygen deficiency (pig model) (Abstract) (3rd Workshop of COST-Action 855 "Diagnosis and Pathogenesis of Animal Chlamydioses", Siena, Italy, 22.-23. September 2005, Bononia University Press, Bologna, Proceedings, S. 24-25)
- Reinhold, P., Langenberg, A. und K. Sachse.** 2005. An experimentally induced infection with Chlamydiaceae results in acute airway obstruction (pig model). *Eur. Resp. J.* **26** [Suppl. 49]:408.

- Reinhold, P., Langenberg, A. und K. Sachse.** 2005. Experimentell induzierte Infektion mit *Chlamydia suis* beim Schwein: Pathophysiologische Konsequenzen für die Sauerstoffversorgung des Organismus (3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Psittakose, Jena, 13.-14. Oktober 2005, Tagungsband)
- Reinhold, P. und D. Marlin.** 2005. Collection, Analysis & Interpretation of Exhaled Breath Condensate (Proceedings of the 23rd American College of Veterinary Internal Medicine [ACVIM], Baltimore, MD, USA, 1.-4. Juni 2005, S. 768-770)
- Reinhold, P., M. Rosenbruch, D. Theegarten und K. Dalhoff.** 2005. Pulmonale Infektionsmodelle: 7. Workshop des Arbeitskreises „Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) in Zusammenarbeit mit den Sektionen Infektiologie und Tuberkulose und Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP) am 17.03.2005 in Berlin. *Pneumologie* **59**:411-427.
- Ruf, R.R., O. Werner, H.-J. Schmitt und P. Wutzler.** 2005. Humane und aviare Influenza – „Vogelgrippe“. *Deutsches Ärzteblatt* **102**:3254-3263.
- Sachse, K. und E. Schubert.** 2005. Aviäre Chlamydiose als Quelle humaner Ornithose – eine wenig beachtete Infektionskette. *Thür. Ärztebl.* **16**:411-413.
- Schröder, C., J. Jäger, R. Bachmann, F. Melzer, E. Schubert, M. Rothe und P. Reinhold.** 2005. Nachweis von Entzündungsmarkern in den Lungen von Kälbern mit klinisch inapparenten Chlamydien-Infektionen (Abstract) (3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Psittakose, Jena, 13.-14. Oktober 2005, Tagungsband)
- Schröder, C., Rothe, M., Jäger, J. und P. Reinhold.** 2005. Speziesvergleichende Untersuchungen zur Nitrit-Konzentration in Atemkondensat-, Serum- und BALF-Proben (Abstract). *Pneumologie* **59** [Suppl. 1]:62.
- Süss, J.** 2005. Zum aktuellen Auftreten der FSME in Europa. *Epi. Bull.* **16**:140-145.
- Süss, J.** 2005. Zeckenalarm. *Gesundheit und Umwelt* **41**:5-7.
- Ulrich, R., S. Essbauer, M. Wenk und J. Koch.** 2005. Gefahr für den Jäger? Pirsch – Magazin für Jagd und Natur **18**:20-21.
- Ulrich, R., A. Kliemt, T. Selhorst und T. Müller.** 2005. Tollwut in Europa. *Beitr. Jagd u. Wildf.* **30**:289-301.
- Ulrich, R. und A. Rang.** 2005. FORUM „Hantaviren“ (Immunologie Aktuell, **III.**, 2005).
- Vahlenkamp, T.W.** 2005. Durchflusszytometrie: Neue diagnostische Möglichkeiten in der Kleintierpraxis: Neuheiten, Fortschritte und Trends aus der Kleintierpraxis. *Vet-MedReport* **29**:6-7.
- Vahlenkamp, T.W.** 2005. Pathomechanismen der FeLV-Infektion. 51. Jahrestagung der DGK-DVG. ISBN 3-938026-09-X, S. 110-111.
- Vahlenkamp, T.W.** 2005. Die Bedeutung regulierender T-Zellen bei der FIV-Infektion der Katze. 51. Jahrestagung der DGK-DVG. ISBN 3-938026-09-X.
- Vahlenkamp, T.W.** 2005. Aviäre Influenza bei Katzen? Beurteilung von klinischen Studien und Berichten aus Asien. *Dtsch. Tierärztebl.* 17-18.
- Werner, O., A. Globig und E. Starick.** 2005. Surveys in free range and indoor farmed poultry for avian influenza and risk assessment for introduction by wild birds (14th World Veterinary Poultry Congress, 22.-26. August 2005, Istanbul/Turkey, S. 213)

Werner, O. und E.F. Kaleta. 2005. Orthomyxoviridae. In: Siegmann, O., Neumann, U. (eds.): Kompendium der Geflügelkrankheiten. Hannover, Schlütersche, S. 135-142.

2.3 Buchbeiträge

Hoffmann, B., M. Beer, H. Schütze und T.C. Mettenleiter. 2005. Fish rhabdoviruses: molecular epidemiology and evolution. In: The World of Rhabdoviruses, CTMI 292, S. 81-117.

Kaleta, E.F. und O. Werner. 2005. Paramyxoviridae. In: Siegmann, O., Neumann, U., eds.: Kompendium der Geflügelkrankheiten. Hannover, Schlütersche, S. 142-152.

Liebler-Tenorio, E.M. 2005. Pathogenesis. In: Goyal, S.M., Ridpath, J.F. (eds.): Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. Blackwell Publishing, Oxford, UK, S. 121-144.

Methner, U. 2005. Salmonellosen. In: Siegmann, Otfried: Kompendium der Geflügelkrankheiten; Hrsg. Ulrich Neumann. – 6. aktualis. u. erw. Aufl. – Hannover: Schlütersche, S. 208-210.

Reinhold, P., C. Deaton und D. Marlin. 2005. Potential for and limitations of exhaled breath analysis in animal models. In: Amann, A. & Smith, D. (eds.): Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., S. 503-514.

Vahlenkamp, T.W. und H. Müller. 2005. Feline Leukämievirus (FeLV)-assoziierte Tumorerkrankungen. In: M. Kessler (Hrsg.) Handbuch der Kleintieronkologie. Parey Verlag, Berlin/Wien. (2. Auflage), ISBN 3830441037.

3 Habilitationen, Dissertationen und Diplomarbeiten

3.1 Habilitationen

Vahlenkamp, T.W.: Immunpathogenese der felines Immunschwächevirus (FIV)-Infektion: Ein Modell für AIDS. (Freie Universität Berlin)

3.2 Dissertationen

Bernhard, R.: Einfluss von Mutationen auf die NS2/3-Prozessierung und Zytopathogenität von Pestiviren (Biologische Fakultät, Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Klopfleisch, R.: Molekulare und pathomorphologische Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener Virusproteine für die Neuroinvasion des Pseudorabiesvirus (Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Semmler, I.: Verpackte Replikons des Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) als neuartige Vakzine (Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München)

3.3 Diplomarbeiten

Arzt, Ch.: Herstellung von luciferasemarkiertem Prionprotein mit dem Baculovirus-Expressionsystem (Biologische Fakultät, Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Böttcher, S.: Identifizierung funktioneller Domänen im essentiellen Tegumentprotein UL36 des Pseudorabies Virus (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

González Carvajal, B.: Charakterisierung der Interleukin-mRNA-Expression im Zäkum nach *Salmonella*-Immunisierung und -Infektion von Hühnerküken (Biologische Fakultät, Friedrich-Schiller Universität Jena)

Mischkale, K.: Charakterisierung pestiviraler Replikons als zytopathogenes und nicht-zytopathogenes Expressionssystem (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Rosenkranz, D.: Identifizierung und Charakterisierung immunogener Proteine des Koi Herpesvirus (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

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.