Bundesministerium
für Verbraucherschutz, Ernährung
und Landwirtschaft

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Friedrich-Loeffler-Institut

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Jahresbericht 2004

**Bundesministerium für
Verbraucherschutz, Ernährung
und Landwirtschaft**

Friedrich-Loeffler-Institut

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Jahresbericht 2004

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: http://fli.bund.de

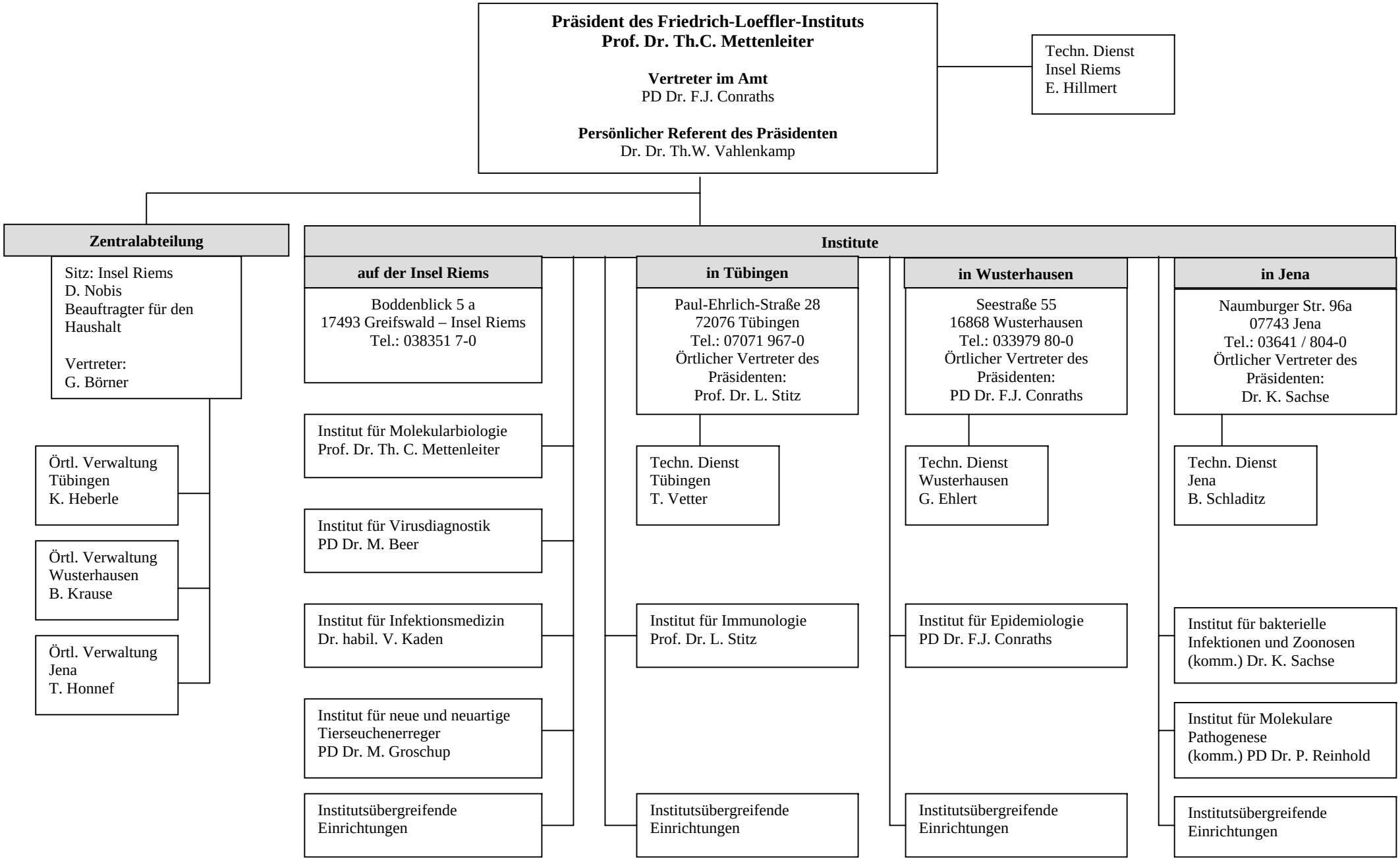
Leiter:
Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. T. C. Mettenleiter

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

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

Insel Riems, 2005

ISSN: 0564-4178


Präsident des Friedrich-Loeffler-Instituts
Prof. Dr. Th.C. Mettenleiter
Vertreter im Amt
PD Dr. F.J. Conraths
Persönlicher Referent des Präsidenten
Dr. Dr. Th.W. Vahlenkamp
Techn. Dienst
Insel Riems
E. Hillmert
Zentralabteilung
Sitz: Insel Riems
D. Nobis
Beauftragter für den Haushalt
Vertreter:
G. Börner
Örtl. Verwaltung Tübingen
K. Heberle
Örtl. Verwaltung Wusterhausen
B. Krause
Örtl. Verwaltung Jena
T. Honnef
Institute
auf der Insel Riems
Boddenblick 5 a
17493 Greifswald – Insel Riems
Tel.: 038351 7-0
Institut für Molekularbiologie
Prof. Dr. Th. C. Mettenleiter
Institut für Virusdiagnostik
PD Dr. M. Beer
Institut für Infektionsmedizin
Dr. habil. V. Kaden
Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger
PD Dr. M. Groschup
Institutsübergreifende Einrichtungen
in Tübingen
Paul-Ehrlich-Straße 28
72076 Tübingen
Tel.: 07071 967-0
Örtlicher Vertreter des Präsidenten:
Prof. Dr. L. Stitz
Techn. Dienst
Tübingen
T. Vetter
Institut für Immunologie
Prof. Dr. L. Stitz
Institutsübergreifende Einrichtungen
in Wusterhausen
Seestraße 55
16868 Wusterhausen
Tel.: 033979 80-0
Örtlicher Vertreter des Präsidenten:
PD Dr. F.J. Conraths
Techn. Dienst
Wusterhausen
G. Ehlert
Institut für Epidemiologie
PD Dr. F.J. Conraths
Institutsübergreifende Einrichtungen
in Jena
Naumburger Str. 96a
07743 Jena
Tel.: 03641 / 804-0
Örtlicher Vertreter des Präsidenten:
Dr. K. Sachse
Techn. Dienst
Jena
B. Schladitz
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
(komm.) Dr. K. Sachse
Institut für Molekulare Pathogenese
(komm.) PD Dr. P. Reinhold
Institutsübergreifende Einrichtungen

Insel Riems, den 11.02.05

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

Vision Riems 2010

vor Ihnen liegt der erste Jahresbericht des 'neuen' Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI), wie die vormalige Bundesforschungsanstalt für Virus-krankheiten der Tiere seit dem Inkrafttreten der 3. Änderung des Tierseuchengesetzes am 26. Juni 2004 heißt. Passend dazu gibt es nun auch ein einheitliches Logo. Diese Umbenennung wie auch die Zusatz-bezeichnung 'Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit' spiegeln den in den vergangenen Jahren erheblich erweiterten Aufgabenbereich der Institution wieder, der weit über die Viruskrankheiten hinausgeht und auch Infektionen durch Bakterien, Parasiten und Prionen umfasst. Doch es wurde nicht nur der Name geändert: auch der gesetzlich festgeschriebene Aufgabenbereich des Instituts wurde erweitert und umfasst nunmehr neben der Forschung auf dem Gebiet der Tierseuchen, der Einfuhr- und Ausfuhruntersuchungen, der epidemiologischen Untersuchung im Falle von Tierseuchenausbrüchen und dem Betreiben nationaler Referenzlaboratorien für anzeigepflichtige Tierseuchen auch die Pflicht zur Sicherstellung einer hohen Qualität der nationalen Tierseuchendiagnostik, zur Veröffentlichung einer amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren sowie zur Erstellung eines Tiergesundheitsjahresberichts. Diese Erweiterung demonstriert auch die zunehmende Bedeutung des Instituts bei der Beratung des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft und der Koordinierung nationaler Tierseuchenbekämpfungsmaßnahmen.

Insgesamt hat sich die Tierseuchensituation in Deutschland weiterhin positiv entwickelt. Es trat im Berichtszeitraum kein Fall von klassischer Schweinepest in Hausschweinebeständen auf und die Schweinepest beim Wildschwein konnte, auch unter Einsatz des am FLI entwickelten Köderimpfstoffs, drastisch reduziert werden. Im Gegensatz dazu macht die vollständige Ausrottung der Tollwut immer noch Probleme, die zukünftig durch noch energischeren und konsequenteren Einsatz der verfügbaren Impfstoffe unter Berücksichtigung der epidemiologischen Situation gelöst werden müssen. Das FLI wird die betroffenen Bundesländer hierbei weiterhin beratend unterstützen.

Im Rahmen eines Berufungsverfahrens wurde im Jahre 2004 unser Mitarbeiter PD Dr. Martin Beer ausgewählt und im September zum neuen Leiter des Instituts für Virusdiagnostik bestellt. Weitere Berufungsverfahren konnten leider nicht erfolgreich abgeschlossen werden und werden daher weitergeführt.

Einen großen Umfang nahmen im Berichtszeitraum die Planungen für die umfangreichen Neubaumaßnahmen auf der Insel Riems ein, mit einem Kostenvolumen von ca. 150 Mio. € die derzeit größte Baumaßnahme des Bundes in den neuen Bundesländern (außerhalb

Berlins). Das Ergebnis einer Machbarkeitsstudie gibt einen Eindruck von den neuen Laboratorien und Stallgebäuden der Sicherheitsstufen L1 bis L4 (siehe Abbildung). In diesen Tagen soll der Vertrag über die Generalplanungsleistungen unterschrieben werden. Ein passendes Datum für die Inbetriebnahme der Neubauten haben wir schon: der 10. Oktober 2010, der 100. Geburtstag des Instituts auf der Insel Riems. Der Zeitplan ist ambitioniert, aber machbar.

Die Beratung des Ministeriums schlägt sich wiederum in einer Vielzahl von Stellungnahmen wieder, deren Zahl von Jahr zu Jahr zunimmt. Obwohl diese im Jahresbericht kaum Beachtung finden, sind sie ein Beweis für die direkte Interaktion zwischen Ministerium und FLI und auch ein Nachweis der notwendigen Beratungsleistungen durch das FLI. Dass 'daneben' aber immer noch eine herausragende Forschung betrieben wird, zeigen nicht nur die im Jahresbericht aufgeführten Publikationen, sondern auch die Ergebnisse von Publikationsvergleichen. So werden im neuesten, von der Zeitschrift 'LaborJournal' veröffentlichten Zitierungsvergleich des Fachgebiets 'Tiermedizin' alleine sieben Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des FLI unter den besten 50 geführt. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass fast alle Bereiche des FLI wie Molekularbiologie, Virologie, Parasitologie, Immunologie und 'Prionologie' vertreten sind. Dies zeigt auch die Breite der wissenschaftlichen Expertise am FLI.

Dass dies alles vor dem Hintergrund zunehmender finanzieller und personeller Restriktionen gelang, ist vor allem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des FLI zu verdanken. Ihnen gilt deshalb wiederum mein Dank für ihren Einsatz, der oftmals die Grenzen 'normaler' Arbeitszeiten sprengt.

Ich hoffe, Sie können dieser optimistischen Einschätzung nach der Durchsicht des Jahresberichts 2004 ebenfalls zustimmen.

Mit besten Grüßen

Prof. Dr. Thomas C. Mettenleiter

Inhaltsverzeichnis

I Aufgabenstellung 7

II Organisation und Personal 7

III Forschung und behördliche Aufgaben 15

A) Ausgewählte Schwerpunktthemen

1 INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE: MOLEKULARE VIROLOGIE ALS WERKZEUG IN DER VAKZINE-ENTWICKLUNG AM BEISPIEL EINES RNA-VIRUS 23

2 INSTITUT FÜR VIRUSDIAGNOSTIK: NEUE WEGE IN DER SCHWEINEPESTBEKÄMPFUNG BEI HAUSSCHWEINEN – EIN AUF ERREGERNACHWEIS UND IMPFUNG GESTÜTZTES TIERSEUCHEN-BEKÄMPFUNGSKONZEPT 31

3 INSTITUT FÜR INFEKTIONSMEDIZIN: DIE KOI HERPESVIRUS-INFEKTION DER CYPRINIDEN – EINE NEUE FISCHSEUCHE 37

4 INSTITUT FÜR NEUE UND NEUARTIGE TIERSEUCHENERREGER: AUFBAU EINES EFFIZIENTEN TSE-VERHÜTUNGS- UND BEKÄMP-FUNGSSYSTEMS IN BULGARIEN – ERFAHRUNGSBERICHT ZU EINEM DEUTSCH-BULGARISCHEN TWINNINGPROJEKT 49

5 INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE: NUCLEAR FACTOR kappaB UND NEUROPROTEKTION NACH INFEKTION 57

6 INSTITUT FÜR EPIDEMIOLOGIE: SCHWEINEPEST BEI WILDSCHWEINEN - EINE SUVEILLANCE DATENBANK FÜR BELGIEN, DEUTSCHLAND, FRANKREICH, LUXEMBURG UND DIE NIEDERLANDE 69

7 INSTITUT FÜR BAKTERIELLE INFEKTIONEN UND ZOONOSEN: DIAGNOSTIK UND BEKÄMPFUNG DER BOVINEN GENITALEN CAMPYLOBACTERIOSE 77

8 INSTITUT FÜR MOLEKULARE PATHOGENESE: MYCOBACTERIUM AVIUM SSP. AVIUM UND SSP. HOMINISSUIS – MOLEKULAR-EPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 85

B) Laufende Forschungsprojekte

1 VIREN

1.1 PICORNAVIREN 95
1.2 CALICIVIREN 96
1.3 CORONAVIREN 100
1.4 FLAVIVIREN 101
1.5 RHABDOVIREN 109
1.6 PARAMYXOVIREN 114
1.7 BORNAVIREN 117
1.8 ORTHOMYXOVIREN 117
1.9 BIRNAVIREN 121
1.10 REOVIREN 122
1.11 RETROVIREN 123
1.12 POCKENVIREN 125
1.13 HERPESVIREN 127
1.14 PAPILLOMAVIREN 139
1.15 NICHT KLASSIFIZIERTE VIREN 140
1.16 IMMUNOLOGIE 140

2 BAKTERIEN

2.1 ESCHERICHIA COLI 145
2.2 CHLAMYDIEN UND COXIELLEN 146
2.3 MYKOBAKTERIEN 150
2.4 SALMONELLEN 154
2.5 CAMPYLOBACTER 157
2.6 BURKHOLDERIA MALLEI 160
2.7 BRUCELLEN 160
2.8 MYKOPLASMENINFEKTIONEN DER WIEDERKÄUER 161
2.9 DURCH ZECKEN ÜBERTRAGENE KRANKHEITEN 161
2.10 BAKTERIELLE UND VIRALE MISCHINFEKTIONEN 162

3 ÜBERTRAGBARE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN 165

4 PARASITEN

4.1 NEOSPORA CANINUM 179
4.2 ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS 181
4.3 TRICHINELLA SPIRALIS 182
4.4 TRITRICHOMONAS FOETUS 182

5 PATHOPHYSIOLOGIE UND LUNGENFUNKTIONSDIAGNOSTIK 185

6 HISTOLOGISCHE, IMMUNHISTOLOGISCHE UND ULTRASTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN 189

7 DIAGNOSTIKENTWICKLUNG UND NEUE NACHWEISVERFAHREN 191

8 ZELLBANK UND VIRUSSTAMMHALTUNG

8.1 ZELLBANK FÜR ZELLLINIEN IN DER VETERINÄRMEDIZIN 195
8.2 VIRUSSTAMMHALTUNG (RIEMSER VIRUSBANK) 197

9 INFORMATIK, BIOSTATISTIK, DOKUMENTATION 199

10 BEHÖRDLICHE AUFGABEN UND DIAGNOSTIK

10.1 ZULASSUNGEN UND CHARGENPRÜFUNGEN 209
10.2 DIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN 212
10.3 AUFGABEN IM RAHMEN DES GENTECHNIKRECHTS 223
10.4 BEHÖRDLICHE AUFGABEN IN EPIDEMIOLOGISCHEN ARBEITSBEREICHEN 223
10.5 ABGABE VON DIAGNOSTIKA 226
10.6 ORGANISIERTE TAGUNGEN UND KURSE 228
10.7 REFERENZLABORATORIEN 229

IV Wissenschaftliche Zusammenarbeit 251
V Veröffentlichungen 261

I Aufgabenstellung

Das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, ist eine selbständige Bundesoberbehörde im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Es betreibt Forschung auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten landwirtschaftlicher Nutztiere und verwandter Wissenschaften. Das FLI nimmt die ihm nach dem Tierseuchen- und Gentechnikgesetz zugewiesenen Aufgaben wahr, veröffentlicht Forschungsergebnisse und pflegt die nationale und internationale Zusammenarbeit mit wissenschaftlichen Persönlichkeiten und Einrichtungen.

II Organisation und Personal

A) Hauptsitz Insel Riems

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Boddenblick 5a
17493 Greifswald - Insel Riems
Telefon (03 83 51) 70
Telefax (03 83 51) 72 19, 71 51, 72 26

A1) Organisatorische Gliederung

Institut für Molekularbiologie
Institut für Virusdiagnostik
Institut für Infektionsmedizin
Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger
Gemeinschaftliche Einrichtungen
Zentrale Verwaltung einschließlich technischer Dienst

A2) Personelle Besetzung

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. T.C. Mettenleiter
Vertreter im Amt: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. F.J. Conraths
Persönlicher Referent des Präsidenten: Dr. Dr. med. vet. T.W. Vahlenkamp
Verwaltungsleiter: Regierungsdirektor D. Nobis

Institut für Molekularbiologie
Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. T.C. Mettenleiter
Vertretung: Direktor und Professor Dr. rer. nat. G. Keil
Wissenschaftliche Mitarbeiter: Dipl. Biol. J. Altenschmidt (teilzeitbesch., bis 05/04), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. W. Fuchs, Dipl. Biol. S. Gentner (DFG, teilzeitbesch., seit 12/04), Dipl. Biol. C. Höhle (teilzeitbesch., seit 05/04), Dipl. Biol. M. Krautwald (DFG, teilzeitbesch., seit 09/04), Dipl. Biol. D. Kühnel (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl. Biopharm. D. Jung (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 12/04), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. A. Karger, Tierarzt R. Klopfleisch (DFG, teilzeitbesch., bis 05/04), Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. B. Klupp, Dipl. Humanbiol. M. Kopp (teilzeitbesch., bis 12/04), 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 (seit 12/04), Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. A. Römer-Oberdörfer, Wiss. Oberrätin H. Schütze (bis 11/04), Wiss. Rat z.A. Dr. Dr. med. vet. T.W. Vahlenkamp (seit 02/04), Dr. med. vet. J. Veits (Drittmittel, bis 07/04), Dr. rer. nat. S. Weber, Tierärztin D. Wiesner (DFG, teilzeitbesch.)
Volontäre: J. Altenschmidt, R. Behrendt, S. Böttcher, A. Brandenburg, D. Dalm, J. Engel, K. Goldmann, D. Köster, S. Kloth, Yu Liang Liu, D. Rosenkranz, A. Sadowski, H. Thierbach

Institut für Virusdiagnostik
Leitung: Wiss. Oberrat PD Dr. met. vet. M. Beer (seit 09/04)
Direktor und Professor Dr. med. vet. H. Schirrmeier (komm. Leitung, bis 09/04)
Vertretung: Direktor und Professor Dr. med. vet. H. Schirrmeier (seit 09/04)
Wiss. Direktorin Dr. med. vet. O. Werner (bis 09/04)
Wissenschaftliche Mitarbeiter: Dipl.-Pharm. M. Adelmann (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 11/04), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. M. Dauber, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. K.R. Depner, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. D. Fichtner (bis 11/04), Tierärztin A. Globig (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierarzt M. Hammer (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. med. vet. B. Hoffmann (bis 06/04), Tierärztin D. Kalthoff (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 01/04), Dr. rer. nat. B. Köllner (bis 11/04), Dr. med. vet. P. König, Dipl.-Biol. K. Kühn (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin I. Semmler (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl.-Chem. E. Starick (seit 12/04), Dipl.-Chem. H.-G. Strebelow
Volontäre: M. Angermann, K. Burghardt, S. Fereidouni, R. Gebert, A. Glawe, M. Hanczaruk, K. Hartwig, M. Heßmann, K. Janicka, N. Kumar, I. Lork, P. Lutze, M. Meyer, A. Stachowski

Institut für Infektionsmedizin
Leitung: Direktor und Professor Dr. med. vet. habil. V. Kaden
Vertretung: Dr. med. vet. R. Riebe
Wissenschaftliche Mitarbeiter: Dipl. Pharm. M. Adelmann (Drittmittel, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. S.M. Bergmann, Tierärztin A. Brauer (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 05/04), Tierärztin I. von Felbert (Drittmittel, teilzeitbesch. seit 01/04), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. U. Fischer, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. D. Fichtner (seit 12/04) Wiss. Direktor Dr. rer. nat. habil. H. Granzow, Tierarzt R. Klopfleisch (teilzeitbesch., seit 06/04), Dr. rer. nat. B. Köllner (seit 12/04), Dipl.-Vet.-Med. G. Kotterba, Wiss. Oberrätin Dr. med. vet. E. Lange, Dipl.-Biol. M. Lenk, Dipl.-Vet.-Med. U. Polster, Dr. rer. nat. I. Reimann (bis 11/04), Tierärztin K. Saenger (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. rer. nat. H. Schütze (seit 12/04), Dipl.-Chem. E. Starick (bis 11/04), Wiss. Oberrat PD Dr. med. vet. J.P. Teifke
Volontäre: Dr. A. Brenn, Dr. Haryanti, Chr. Hartmann, Dr. J. Kemptner, P. Kotterba, H. Müller, K. Meyer, B. Özkan

Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger
Leitung: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. M.H. Groschup
Vertretung: Wiss. Rätin Dr. med. vet. A. Buschmann
Wissenschaftliche Mitarbeiter: Dr. A. Brenn (Drittmittel, seit 10/04), Tierärztin C. Diephaus-Borchers (Drittmittel, bis 08/04), Dr. rer. nat. M. Eiden, Dr. rer. nat. M. Geissen (Drittmittel), Tierärztin A. Gretzschel (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. med. vet. B. Hoffmann (seit 07/04), Tierärztin C. Hoffmann (Drittmittel, seit 10/04), Tierärztin L. Kupfer (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin A. Oelschlegel (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl. Biochem. J. Proft (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 08/04), Dipl.-Biol. J. Schultz (Drittmittel, bis 10/04), Dr. rer. nat. G. Wachlin (Drittmittel), Dr. med. vet. A. Weber, Dr. med. vet. U. Ziegler
Volontäre: C. Metz

B) Standort Tübingen

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Paul-Ehrlich-Straße 28, 72076 Tübingen
Postfach 11 49, 72001 Tübingen
Telefon (0 70 71) 967-0
Telefax (0 70 71) 967-105, 967-303, 967-305

B1) Organisatorische Gliederung

Institut für Immunologie
Gemeinschaftliche Einrichtungen
Verwaltung einschließlich technischer Dienst

B2) Personelle Besetzung

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. T.C. Mettenleiter
Örtlicher administrativer Vertreter: Direktor und Professor Prof. Dr. med. vet. L. Stitz
Örtlicher Verwaltungsleiter: Regierungsamtmann K. Heberle

Institut für Immunologie

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 Prof. Dr. med. vet. M. Büttner, Dr. rer. nat. J. Cox, Tierarzt A. Ege (Drittmittel, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. P.-J. Enzmann, Dipl. Biochem. J. Fricke (DFG, teilzeitbesch.), Dipl. Agr. W. Gerner (Drittmittel, bis 06/04), Dr. Dipl. Biol. B. Klein (Drittmittel), Dr. med. vet. B. Klevenz (Drittmittel), Dr. rer. nat. N. Koch (Drittmittel), S. Liebscher (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 03/04), Dipl. Biol. C. Luttermann (DFG, teilzeitbesch.), Tierärztin A. Marquardt (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 10/04), Dr. med. vet. C. Marquardt (Drittmittel, teilzeitbesch., bis 03/04), Wiss. Oberrat Dr. rer. nat. habil. O. Marquardt, Wiss. Oberrat PD Dr. rer. nat. G. Meyers, Dr. med. vet. W. Müller, Dipl. Biol. K. Muschko (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierärztin S. Nebrich (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dipl. Biol. B. Petsch (Drittmittel, teilzeitbesch.), Wiss. Oberrat PD Dr. rer. nat. O. Planz, Wiss. Direktor Dr. rer. nat. H.-J. Rziha, Wiss. Oberrat Prof. Dr. rer. nat. A. Saalmüller (bis 02/04), A. Schüßler (Drittmittel, teilzeitbesch. bis 10/04), Dipl. Biochem. B.A. Tews (Drittmittel, teilzeitbesch.), Tierarzt H. Voigt (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. rer. nat. D. Wienhold (Drittmittel)
Volontäre: C. Arzt, R. Bernhard, T. Fischer, C. Fuchs, R. Krüger, Y. Küster, T. Lehr, Dr. med. vet. C. Marquardt, P. Marx-Stölting, K. Müller, C. Nagler, T. Richter, C. Seeger, M. Scheible, P. Schöffler, E. Stechemesser, Z.-X. Yan

C) Standort Wusterhausen

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Seestraße 55
16868 Wusterhausen
Telefon (03 39 79) 80-0
Telefax (03 39 79) 80-2 00, 80-222

C1) Organisatorische Gliederung

Institut für Epidemiologie
Gemeinschaftliche Einrichtungen
Verwaltung einschließlich technischer Dienst

C2) Personelle Besetzung

Leitung: Präsident und Professor Prof. Dr. rer. nat. T.C. Mettenleiter
Örtlicher administrativer Vertreter: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. F.J. Conraths
Verwaltungsleiterin: Regierungsamtfrau B. Krause

Institut für Epidemiologie

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. F.J. Conraths
Vertreter: Direktor und Professor Dr. med. vet. M. Kramer
Wissenschaftliche Mitarbeiter: Dr. med. vet. D. Beier, Dr. med. vet. D. von Blumröder (Drittmittel, bis 03/04), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. L. Geue, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. K. Henning, Dr. med. vet. K. Kroschewski, Dipl.-Ing. A. Micklich, Wiss. Oberrat Dr. med. vet. T. Müller, Dr. med. vet. C. Pötzsch (Drittmittel), Dr. rer. nat. C. Pottgießer (Drittmittel), Wiss. Oberrat Dr. med. vet. G. Schares, Wiss. Oberrat PD Dr. agr. T. Selhorst, Wiss. Rat Dr. med. vet. C. Staubach, Wiss. Oberrätin Dr. med. vet. K. Tackmann, Dr. agr. J. Teuffert, PD Dr. R. Ulrich (Drittmittel, ab 04/04), J. Vesely (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 11/04), Tierärztin K. Wiedl (Drittmittel, teilzeitbesch.), Dr. rer. nat. M. Ziller
Volontäre: R. Bruzinskaite, D. Czeck, K. Hilberath, Tierarzt J. Meyer, DVM J. Naumann, J. Vesely

D) Standort Jena

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Naumburger Str. 96 a
07743 Jena
Telefon 03641/804-0
Telefax 03641/804-228, -350

D1) Organisatorische Gliederung

Institut für Bakterielle Infektionen und Zoonosen
Institut für Molekulare Pathogenese
Gemeinschaftliche Einrichtungen
Verwaltung einschließlich technischer Dienst

D2) Personelle Besetzung

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

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen

Leitung: Dr. rer. nat. K. Sachse (komm. Leitung)
Vertretung: Dr. med. vet. U. Methner
Wissenschaftliche Mitarbeiter: Wiss. Oberrätin Dr. rer. nat. U. Dinjus, Dr. med. vet. M. Elschner, Dipl.-Biol. S. Göllner (teilzeitbesch.), Dipl.-Biol. A. Haase (Drittmittel, teilzeitbesch. seit 03/04), Dr. rer. nat. M. Höfer, Wiss. Oberrat Dr. H. Hotzel, Dr. med. vet. C. Klaus, Dr. med. vet. F. Melzer, Dr. med. vet. U. Methner, PD Dr. med. vet. habil. I. Moser, Dr. rer. nat. J. Müller, Dr. rer. nat. W. Müller, Dr. med. vet. P. Otto, Dr. med. vet. A. Raßbach, Dipl.-Biol. R. Reiche, Dr. rer. nat. E. Schubert, Dr. med. vet. habil. F. Schulze, Dir. und Prof. PD Dr. habil. J. Süss
Volontäre: R. Anichin, A. Bagon, K. Bauer, S. Dahms, A. Dell'Ariccia, N. Jänisch, R. Kunze, B. Novak, A. Schmidt, A. Skrypnyk

Institut für Molekulare Pathogenese

Leitung: PD Dr. med. vet. habil. P. Reinhold, PhD (komm. Leitung)
Vertretung: Dr. rer. nat. I. Hänel
Wissenschaftliche Mitarbeiter: Dipl.-Chem. R. Bachmann, Dr. rer. nat. A. Berndt, Dr. rer. nat. E. Borrmann, Dr. med. vet. M. Bretschneider (bis 08/04), Dr. rer. nat. J. Gottschaldt, Dr. med. vet. M. Heller, Tierärztin J. Jäger (teilzeitbesch.), Dr. med. vet. H. Köhler, Prof. Dr. med. vet. habil. E. Liebler-Tenorio, Dr. rer. nat. P. Möbius, Dipl.-Biol. J. Pieper (Drittmittel, teilzeitbesch., seit 03/04), Tierärztin S. Reißig (teilzeitbesch., seit 05/04), Tierärztin C. Schröder (teilzeitbesch., seit 04/04), Dipl.-Ing. E. Thalmann
Volontäre: J. Fröhlich, B. González, N. Hitzel, T. Reichel, C. Rubinek, J. Seifert, P. Shutchenko, Dr. med. vet. C. Siegling-Vlitakis, A. Vergara

Bioinformatik

Dr. rer. nat. R. Diller

Übersicht über vorhandene Personalstellen

Stand 31.12.2004

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler				Angestellte (ohne Verwaltungspersonal)				Arbeiter				Verwaltungs-personal	Gesamt
	a	B	c	ges.	a	b	c	ges.	a	b	c	ges.		
Insel Riems														
1. Leitung u. zentrale Dienste einschließlich Zulassungsstelle	6			6	4,5			4,5					3	13,5
2. Institut für Molekularbiologie	11	4,5	2	17,5	14	4	1	19	2			2		38,5
3. Institut für Virusdiagnostik	10	3,5		13,5	10	4		14	2			2		29,5
4. Institut für Infektionsmedizin	14	1,5	0,5	16	14			14	3			3		33
5. Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger	7	7,5		14,5	6	5		11	1	2,5		3,5		29
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	32			32		38
8. Hauptverwaltung									13			13	24,25	37,25
Tübingen														
1. Sekretariat													1	1
2. Institut für Immunologie	10	6,5	0,5	17	14,375	2,0		16,375	5			5		38,375
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
Wusterhausen														
1. Sekretariat													2	2
2. Institut für Epidemiologie	15	2,5		17,5	12,5	1		13,5						31
3. Gemeinsch. Einrichtungen														
a) Bibliothek					1			1						1
b) Versuchstierhaltung									4			4		4
c) Nährmedienherstellung					1			1						1
d) Fotolabor					1			1						1
4. Betriebstechnischer Dienst					1			1	4			4		5
6. Örtliche Verwaltung									4			4	3,75	7,75

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

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler				Angestellte (ohne Verwaltungspersonal)				Arbeiter				Verwalt. personal	Gesamt
	a	B	c	ges.	a	b	c	ges.	a	b	c	ges.		
Jena														
1. Sekretariat													2	2
2. Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen	17	1		18	21			21	4			4		43
3. Institut für molekulare Pathogenese	10	1		11	18,75	0,5		19,25	1			1		31,25
4. Gemeinsch. Einrichtungen														
a) Imformationszentrum	1			1	2			2						3
b) Bibliothek					1			1						1
c) Versuchstierhaltung									9			9		9
d) Zentrallager/Nährmedien					1			1	3			3		4
5. Betriebstechnischer Dienst					1			1	7			7		8
6. Örtliche Verwaltung									4			4	5	9
Gesamt	101	28	3	132	146,125	16,5	1	163,625	146	2,5		148.5	48	492,125

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

III Forschung und behördliche Aufgaben
Allgemeiner Überblick

Satzungsgemäß hat das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI) die Aufgabe, Forschung auf dem Gebiet infektionsbedingter Tierkrankheiten und verwandter Wissenschaften zu betreiben. Außerdem ist das FLI mit der Wahrnehmung amtlicher Aufgaben nach dem Tierseuchengesetz und dem Gentechnikgesetz betraut.

Das FLI gliedert sich in acht Institute an vier Standorten (Insel Riems, Jena, Tübingen, Wusterhausen), die gemeinschaftlichen Einrichtungen und die Verwaltung. Angegliedert ist das WHO-Tollwut-Referenzzentrum für Europa. Von den 492 Beschäftigten sind 132 Wissenschaftler.

Das **Institut für Molekularbiologie** (IMB) befasst sich mit der molekularen Charakterisierung viraler Krankheitserreger landwirtschaftlicher Nutztiere, wobei vorrangig Herpesviren, Orthomyxoviren, Birnaviren, Flaviviren und Paramyxoviren bearbeitet werden. Hierzu ist es in den Bereichen Molekularbiologie, Virologie und Zellbiologie tätig. Im Rahmen der molekularen Analyse viraler Erreger werden Untersuchungen zur Genomstruktur und Genexpression durchgeführt. Im Vordergrund steht dabei die funktionelle Charakterisierung viraler Proteine hinsichtlich deren Rolle bei der Virusreplikation, Pathogenese und Immunantwort. Ziel ist die Aufklärung der molekularen Interaktionen zwischen Wirtszelle und Erreger, wobei neben modernen molekularbiologischen Verfahren auch Proteomanalyse- und Videomikroskopietechniken zur Anwendung kommen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten liefern die Grundlage für die gezielte Entwicklung von Impfstoffen und diagnostischen Verfahren.

Covering the fields of biology, virology and cell biology, the **Institute of Molecular Biology** focuses on the characterisation and molecular analysis of viral pathogens affecting domesticated animals, in particular herpesviruses, orthomyxoviruses, birnaviruses, flaviviruses and paramyxoviruses. Within the framework of the molecular analysis of viral pathogens, investigations on the genome structure and gene expression are carried out, especially with regard to the functional characterisation of viral proteins and their role in virus replication, pathogenesis and immune response. The investigations aim at elucidating the molecular interactions between host cell and pathogen using not only modern molecular biological methods but also proteome analysis and videomicroscopy. The results of these studies form the basis for the targeted development of vaccines and diagnostic procedures.

Im **Institut für Virusdiagnostik** (IVD) werden veterinärmedizinisch bedeutsame Viruserkrankungen bei Nutztieren schwerpunktmäßig aus diagnostischer und differenzialdiagnostischer Sicht bearbeitet. Besonderes Augenmerk wird auf anzeigepflichtige Tierseuchen gelegt. So sind im Institut nach ISO/IEC 17025 akkreditierte 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 und seit dem 15.07.2004 das Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease angesiedelt. Ihnen obliegt neben überwiegend anwendungsorientierten

Forschungsaufgaben die Wahrnehmung amtlicher und hoheitlicher Aufgaben entsprechend nationaler und europäischer Gesetzgebung. Im Institut werden Verfahren für die Diagnose virusbedingter Tierkrankheiten erarbeitet, verbessert und validiert, Prüfungen von Diagnostika entsprechend Tierseuchengesetz vorgenommen sowie kommerziell nicht verfügbare Labordiagnostika entwickelt und bereitgestellt. Der Virusbank obliegt die Sammlung, Charakterisierung, Pflege und Abgabe von authentischen Virusstämmen und homologen Antiseren unter definierten Bedingungen. Ein weiterer Schwerpunkt des Instituts liegt in der Herstellung monoklonaler Antikörper für verschiedene Arbeitsgruppen des Hauses und zur Verwendung in der Tierseuchendiagnostik.

The **Institute of Diagnostic Virology** studies economically important virus diseases of animals, mainly in terms of diagnosis and differential diagnosis. Special attention is given to notifiable diseases. National reference laboratories for classical swine fever, fowl plague, Newcastle disease, bovine herpesvirus 1 infection, infectious equine anemia, porcine encephalomyelitis, foot-and-mouth-disease, swine vesicular disease and African swine fever and – since July 15, 2004 – for bovine viral diarrhea/mucosal disease are part of the institute and have been accredited officially according to ISO/IEC 17025. They conduct applied research and have official duties according to national and European legislation. Furthermore, diagnostic procedures are being developed, improved, and evaluated. Commercially available diagnostics are tested, and reagents which are not available commercially are developed and supplied to regional laboratories. The laboratory in charge of the virus strain bank focuses on the collection, characterisation, maintenance and delivery of authentic virus strains and appropriate antisera. In addition, the generation of monoclonal antibodies for research and diagnosis is one of the major tasks of the institute.

Das **Institut für Infektionsmedizin** (IMED) betreibt angewandte Forschung zur Ätiologie und Pathogenese viral, bakteriell und multifaktoriell bedingter Krankheiten der Tiere mit dem Ziel der Entwicklung immunprophylaktischer Maßnahmen und der Ausarbeitung von Bekämpfungsstrategien. Zur Aufklärung von Erreger-Wirtstier-Beziehungen, d.h. des Infektions- und Krankheitsablaufes im Tier, finden virologische, bakteriologische, molekularbiologische, immunologische sowie nach tierexperimentellen Studien auch pathomorphologische und molekularpathologische Methoden in Verbindung mit der elektronenmikroskopischen Analyse von Ultrastrukturen Anwendung. Von aktueller Relevanz sind Untersuchungen zur Immunprophylaxe und Pathogenese der Klassischen Schweinepest bei Wild- und Hausschweinen, zur Diagnostik und Bekämpfung virusbedingter Fischkrankheiten sowie zur Immunologie von Nutzfischen. In Zusammenarbeit mit anderen Instituten des FLI werden Studien zur 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. Multifaktorell bedingte Infektionskrankheiten (Faktoren-krankheiten) 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 Muschelkrankheiten und seit Dezember 2004 auch das Nationale Referenzlabor für Fischkrankheiten sowie die Versuchstierhaltung des Standortes angesiedelt.

The **Institute of Infectology** performs application-oriented research in the field of etiology and pathogenesis of viral and bacterial diseases of animals and is involved in the elaboration

and development of control strategies and immunoprophylactical measures. The major task of the institute is the elucidation of pathogen-host-interactions during the course of infection and disease. Scientific disciplines such as virology, pathology, electron microscopy, molecular biology, bacteriology and immunology are the basics and contribute equally to this research. The scientific work concentrates on classical swine fever in wild boar and domestic pigs and on diagnosis and control of virus diseases of fish. In collaboration with other institutes studies on bovine retrovirus infections, on Newcastle disease and fowl plague and on infectious diseases of the respiratory and gastrointestinal tract of pigs in particular multifactorial disease complexes are carried out.
Part of the institute is the "Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine" aiming at supporting scientists at the FLI and other institutions by establishing, characterizing and providing relevant cell lines for research and diagnostic purposes. The institute organizes the national reference laboratory for mollusc diseases and since December 2004 also the national reference laboratory for fish diseases. Their tasks are the diagnosis including typing and characterization of pathogenic microorganisms, coordination and control of diagnostic procedures in regional diagnostic centres and the production of diagnostic reagents. Furthermore, the institute is responsible for the husbandry of laboratory animals for all institutes on the Isle of Riems.

Das **Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger** (INNT) 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 Prüfung von BSE-Schnelltests und die fortlaufende Chargenkontrolle und Chargenfreigabe dieser Schnelltests.
Im Bereich der Forschung befasst sich das INNT primär mit Studien zur Verbesserung und Entwicklung neuer Nachweismethoden für BSE und Scrapie und Untersuchungen zur Typisierung von europäischen BSE- und Scrapie-Isolaten aus Wiederkäuern. Es wurden transgene Mausmodelle zur Analyse der Übertragbarkeit von TSE-Erregern 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 dabei sehr geeignete Systeme zur Beantwortung dieser Fragestellung dar. Das Institut beherbergt die nationale BSE-Probenbank (Teil der nationalen TSE-Plattform) und sammelt hierfür systematisch Verdachtsproben und andere Proben mutmaßlich exponierter Tiere, die anderen deutschen TSE-Arbeitsgruppen auf Anfrage und in Abstimmung mit der Forschungsplattform zur Verfügung gestellt werden.
Neben TSE-Erkrankungen werden auch neue Infektionskrankheiten („Emerging Diseases“) am INNT untersucht. Beispiele dafür sind das Nipah-Virus und das Hendra-Virus. Da für die Arbeiten mit diesen hochvirulenten Viren Sicherheitsstufe 4-human notwendig ist, müssen die Untersuchungen vorerst auf biochemische und molekularbiologische Fragestellungen und auf die Etablierung diagnostischer Nachweisverfahren beschränkt bleiben.

The **Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases** fulfils the duties of the national reference laboratory (NRL) for the diagnostic surveillance of TSE diseases. Further responsibilities are the testing of novel BSE rapid assays and the ongoing control and release of production batches of these tests.
Besides the official responsibilities, the INNT focuses on the improvement and development of diagnostic methods for BSE and scrapie and on the examination of European BSE and scrapie isolates from ruminants. Transgenic mouse models for the analysis of interspecies

TSE transmissibility and of the importance of the glycosylation of the prion protein were developed. Examination of the domains contributing to protein conversion in scrapie-infected cell cultures or in cell-free systems is a suitable way of addressing these questions. The institute houses the national BSE tissue archive (as part of the national "TSE Research Platform") and, therefore, systematically collects tissue samples of suspect cases and other samples of suspectedly exposed animals, which are provided to the German TSE working groups on request and in agreement with the TSE Research Platform. The same applies to the supply of reference materials. After thorough preparations the institute started a BSE pathogenesis study on the Isle of Riems. The most important official task of the institute is the confirmatory testing of all suspect cases of BSE and scrapie by means of the diagnostic methods approved by the OIE (immunoblot and/or immunohistochemical examination). In addition, the national TSE reference centre is responsible for coordination of the BSE surveillance. Repeated meetings with the official and private BSE testing laboratories have been carried out to improve the exchange of experiences in this field. A ring trial has been prepared. Further, the approval of new BSE rapid tests as well as batch releases of already approved test kits count among the tasks of the institute. In addition, the institute is asked regularly for scientific advice on current problems with regard to BSE within the framework of political decisions.
In addition to the TSE diseases, emerging infectious diseases are also under investigation at the INNT, such as the Nipah virus and the Hendra virus. Because of the high pathogenicity of these viruses a biosafety laboratory of level 4-human is necessary for the work. For this reason only biochemical and molecular biological questions will be under investigation in the near future.

In die Zuständigkeit des **Instituts für Immunologie** (IfI) fällt ein Teil der amtlichen und behördlichen Aufgaben des FLI 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 Stellungnahmen 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 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.

The Institute of **Immunology** is involved in the fulfilment of official tasks such as the diagnosis of exotic animal diseases, in the examination of animals and animal products for import/export purposes, as well as in the registration of vaccines and diagnostics for various diseases according to the national regulation on animal vaccines. Immunological and molecular biological methods, in particular for the diagnosis of virus diseases of animals, are developed and improved. Accompanying research on the molecular biology of viruses creates the scientific basis for assessing the risks associated with the release of genetically modified microorganisms. In order to improve and develop new immunological disease control strategies, molecular biological examinations on various viruses are carried out with the aim to develop live vaccines from recombinant viruses. Research is done on pestiviruses (classical swine fever virus; bovine viral diarrhea virus), caliciviruses (rabbit hemorrhagic disease virus), herpesviruses (pseudorabies virus), parapoxviruses and fish rhabdoviruses. Immunological research at the institute aims at the elucidation of the cellular and humoral immune response to virus infections. The insights gained in these studies are used to improve the efficacy of virus vaccines. The interaction between viruses and immune cells is studied with the aim to elucidate immunopathological processes of virus infections on the B- and T-cell level. Borna disease is investigated as a model of a T-cell mediated immunopathological disease in natural hosts and laboratory animals. Emphasis is laid on the protective effects of an early induction of humoral and cellular immune reactions; in addition, cellular mechanisms are investigated, which result in degenerative changes in the brain. Immunological and cell biological examinations on transmissible spongiform encephalopathies aim at identifying the pathological mechanisms and at finding ways for a possible intervention in these degenerative brain diseases. Research in the field of fish viruses focusses on the elucidation of the molecular epidemiology of fish pathogenic rhabdoviruses and on the development of vaccines.

Das **Institut für Epidemiologie** (IfE) beschäftigt sich mit der Epidemiologie einheimischer Tierseuchen (z. B. BSE, Klassische Schweinepest, Tollwut), der Prävention nicht einheimischer Infektionskrankheiten (Risikobewertungen bei der Einfuhr, Frühwarnsysteme) und den biomathematischen und epidemiologischen Grundlagen der Risikobewertung. Mit modernen epidemiologischen Methoden, die auch auf mathematische Modelle und geografische Informationssysteme zurückgreifen, werden neue Erkenntnisse gewonnen, die in die praktische Tierseuchenbekämpfung einfließen. Darüber hinaus nimmt das Institut behördliche Aufgaben wahr, insbesondere im Zusammenhang mit dem Tierseuchennachrichtensystem (TSN) und dem Projekt ANIMO/TRACES der Mitgliedsstaaten 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.

The **Institute of Epidemiology** investigates the epidemiology of animal diseases that occur endemically in Germany (e.g. BSE, classical swine fever, rabies), works on the prevention of non-endemic animal diseases (import risk assessment, early-warning systems) and on the biomathematical and epidemiological principles of risk assessment. New insights are gained using modern epidemiological methods that include mathematical modelling and geographic information systems, and are prepared for an application in practical disease control. In addition, the institute has administrative duties which include the national electronic animal disease reporting system (TSN) and the ANIMO/TRACES project of the member states of the Eureopean Union. The institute also contributes to the development of electronic tools for the management of animal disease control. Laboratory-based working groups conduct epidemiological studies. The evaluation of diagnostic techniques for epidemiological purposes as well as an involvement as reference laboratories at both, the national and the international level for certain diseases are prerequisites for optimising the validity of study results. The main topic of research are notifiable animal diseases, but also other infectious diseases which are economically important or represent a risk for human health (zoonoses) are studied, e.g. Q-fever, chlamydiosis, salmonellosis, infections with enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, toxoplasmosis, neosporosis, echinococcosis. The reservoir function of animal populations (e.g. wildlife animals) for pathogens causing animal diseases in domestic animals is investigated.

Das **Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen** (IBIZ) betreibt Forschung auf den Gebieten der Ätiologie und Bekämpfung von Infektionskrankheiten der Tiere. In diesem Zusammenhang werden auch Untersuchungen zur Pathogenese, Diagnostik und Epidemiologie dieser Erkrankungen durchgeführt. Ein bedeutender Teil der Arbeiten ist auf Krankheiten und Krankheitserreger ausgerichtet, die, vom Tier stammend, eine direkte oder indirekte Gesundheitsgefährdung für den Menschen darstellen. Das Institut verfolgt aktuelle Entwicklungen in der Tierhaltung und der Bekämpfung von Tierseuchen, um möglichen Gefahren für Tier und Mensch bereits im Vorfeld begegnen zu können. Das Tätigkeitsfeld umfasst vorwiegend durch Bakterien bedingte anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten, sowie Tierkrankheiten mit großer ökonomischer Relevanz und Zoonosen. In die Forschungen werden dabei landwirtschaftliche Nutztiere, Heim- und Zootiere sowie auch Wildtiere einbezogen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten dienen der Entwicklung und Optimierung diagnostischer Verfahren sowie der Erarbeitung von Bekämpfungsstrategien. Im Mittelpunkt der Forschungstätigkeit stehen durch Campylobacter, Chlamydien, Mykobakterien und Salmonellen 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. Hoheitliche Aufgaben werden insbesondere im Rahmen der Tätigkeit der nationalen Referenzlaboratorien für die nachfolgenden Krankheiten wahrgenommen: Beschälseuche, Brucellose, kontagiöse equine Metritis, Milzbrand, Psittakose, Rauschbrand, Rotz, Salmonellose der Rinder, Tuberkulose der Rinder, Vibrionenseuche der Rinder und durch Zecken übertragene Krankheiten.

The **Institute for Bacterial Infections and Zoonoses** conducts research in the fields of etiology and control of infectious animal diseases. In this context, investigations on pathogenesis, diagnosis and epidemiology of these diseases are also carried out. An important

part of the activities is directed towards diseases and pathogenic agents which originate from animals and constitute a direct or indirect health risk to man. The institute pursues current developments in animal husbandry and control of zoonoses in order to be able to address possible health threats to animals and man well in advance. The spectrum of activities comprises mainly notifiable animal diseases but also other diseases of great economic relevance, as well as zoonoses. Besides livestock, pet and zoo animals as well as wildlife are also included in research. The results of these activities will serve for the development and optimisation of diagnostic procedures and the design of control strategies. Research projects are focusing on infections caused by campylobacter, chlamydiae, mycobacteria, salmonellae and selected viral infections. The following topics are addressed independently of the respective pathogen: investigations on the prevalence of causative agents, characterisation of transmission routes and mechanisms, aspects of pathogen persistence, elucidation of infection chains and epidemiological relationships using classical and molecular methods, zoonotic importance of certain pathogens, establishing animal infection models and examination of therapeutic possibilities using such models. Official tasks included the activities of the national reference laboratories for dourine, brucellosis, contagious equine metritis, anthrax, psittacosis, blackleg, glanders, bovine salmonellosis, bovine tuberculosis, bovine genital campylobacteriosis, and tick-borne diseases.

Im **Institut für molekulare Pathogenese** (IMP) werden wissenschaftliche Untersuchungen zur Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Infektionserregern und Wirtsorganismen bei der Entstehung und Verbreitung von Infektionskrankheiten der Tiere durchgeführt. Im Mittelpunkt der Forschungstätigkeit stehen folglich Erreger-Wirt-Interaktionen sowie Arbeiten zur Erreger-Charakterisierung bei den verschiedensten bakteriell bedingten und bei ausgewählten viralen Infektionen und Erkrankungen. Dies betrifft anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten, Tierkrankheiten mit großer ökonomischer Relevanz und durch direkten Tierkontakt übertragbare oder lebensmittelbedingte Zoonosen. Dabei werden neben landwirtschaftlichen Nutztieren auch Heim- und Zootiere sowie Wildtiere einbezogen. Die Forschungstätigkeiten zur Pathogenese sind essenzielle Grundlage zur Erarbeitung verbesserter Strategien zur Diagnostik, Prophylaxe und effektiven Bekämpfung der o.g. Infektionskrankheiten bei Tieren sowie zum Schutze des Menschen. Die Grundlage der wissenschaftlichen Kompetenz des Instituts bilden die auf den Gebieten der Immunologie, Pathologie/Histologie, Zellbiologie, Molekularbiologie, Biochemie und Physiologie/Pathophysiologie tätigen Arbeitsgruppen sowie eine solide tierexperimentelle Basis. Die dem Institut zugewiesenen Referenzaufgaben (Paratuberkulose, Lungenseuche) dienen der Überwachung von anzeigepflichtigen Tierseuchen und Zoonosen.

Research conducted at the **Institute for Molecular Pathogenesis** focuses on interactions between causative agents of animal infection and host organisms during emergence and spread of disease. Consequently, projects on pathogen-host relationships and the characterisation of the agents of various bacterial and selected viral infections and diseases are in the centre of the research activities. The subjects include notifiable animal diseases, other diseases of great economic relevance, as well as zoonoses transmitted by direct contact to the animal or through food. These phenomena are investigated in livestock, pet and zoo animals, as well as in wildlife. Generally, research activities on the pathogenesis provide an essential basis for the elaboration of improved strategies in diagnosis, prevention and effective control of the above-mentioned infectious diseases in animals, as well as for the protection of human health. The basis of the scientific competence of the institute is formed by the various working groups dealing with the areas of immunology, pathology/histology, cell biology, molecular biology and physiology/pathophysiology, as well as solid expertise and versatile

facilities for animal experiments. Official reference tasks, i.e. the national reference laboratories for paratuberculosis and contagious bovine pleuropneumonia contribute to the surveillance of notifiable and other animal diseases.

A) SCHWERPUNKTTHEMEN

1 INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE: MOLEKULARE VIROLOGIE ALS WERKZEUG IN DER VAKZINE-ENTWICKLUNG AM BEISPIEL EINES RNA-VIRUS

Mundt, E.*

Für die gezielte Veränderung viraler RNA-Genome ist es notwendig, diese in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, da die Erzeugung rekombinanter RNA durch molekulare Techniken wegen der begrenzten Verfügbarkeit entsprechender Enzyme auch heute noch sehr beschwerlich und in ihrem Umfang begrenzt ist. Im Gegensatz dazu ist die rekombinante DNA-Technologie eine ausgezeichnet entwickelte und breit angewandte Technik in den Naturwissenschaften. Die Herstellung transgener Pflanzen und Tiere, der Einsatz der rekombinanten Technologie in der Pflanzen- und Tierzüchtung, neue Heilungsmethoden mittels Gentherapie sowie die Nutzung der Gentechnik in der Lebensmittelherstellung und in der Entwicklung neuer pharmazeutischer Produkte sind Beispiele für die breite Anwendung dieser Technologie in nahezu allen Lebensbereichen.

Zur Manipulation viraler RNA-Genome werden so genannte reverse genetische Systeme (RGS) genutzt. Dazu werden nach der dazu notwendigen Bestimmung der vollständigen Sequenzen des RNA-Genoms diese in cDNA transkribiert und anschließend kloniert. Die viralen cDNA-Sequenzen befinden sich dann meist unter der Kontrolle von heterologen Promotoren. Unter Nutzung dieser Promotoren wird die cDNA in virale cRNA transkribiert. Diese virale cRNA dient dann nach Transfektion in empfängliche eukaryonte Zellen zur Erzeugung infektiöser viraler Partikel.

Seit der Etablierung des ersten RGS für ein bakterielles RNA-Virus (Qb-Virus, Taniguschi et al., 1978) und kurze Zeit später für das eukaryonte Virus der infektiösen Poliomyelitis (Racaniello and Baltimore, 1981) wurden für viele Familien von RNA-Viren RGS etabliert und vorwiegend für Untersuchungen in der Grundlagenforschung genutzt. Erst mit dem Verständnis für die molekularen Grundlagen der Mechanismen der viralen Replikation konnten Wege für die Erstellung neuer Impfstoffkonzepte (Markerkonzept, Herstellung chimärer Viren), für die Nutzbarmachung von RNA-Viren als Genfähren zur Gentherapie und für die zielgerichtete Verbesserung bestehender Impfstoffe gegangen werden. Bisher wurden RGS für Vertreter nahezu aller Familien animaler RNA-Viren etabliert (*Alphaviridae, Arteriviridae, Astroviridae, Birnaviridae, Bornaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Picornaviridae, Rhabdoviridae*). Für nur zwei RNA-Virusfamilien (*Reoviridae, Arenaviridae*) wurden solche Systeme bisher nicht beschrieben.

Hier soll am Beispiel des RGS für *Birnaviridae* beschrieben werden, wie mit dessen Nutzung die Grundlagen für neue Impfstoffkonzepte ermittelt wurden und wie ein solcher Impfstoffkandidat zielgerichtet etabliert wurde. Die *Birnaviridae* sind in drei Genera unterteilt (*Aquabirnavirus, Avibirnavirus, Entomobirnavirus*) und umfassen Viren mit einem doppelsträngigen RNA-Genom (Delmas et al., 2004) aus zwei RNA-Segmenten, A und B. Unsere Experimente wurden mit dem Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV, Genus *Avibirnavirus*) durchgeführt. Das IBDV ist ein weltweit verbreitetes, für Hühnergeflügel pathogenes Virus, das aufgrund von antigenen Unterschieden in zwei Serotypen unterteilt

wird. Vertreter des Serotyps 1 sind obligat pathogen, wohingegen Vertreter des Serotyps 2 apathogen für das Hühnergeflügel sind. Zielzellen des IBDV sind die in der Bursa Fabricii proliferierenden B-Lymphozyten, die bei der lytischen Infektion zerstört werden. Daraus resultiert auch die zu beobachtende humorale Immunsuppression, die in der Geflügelproduktion zu Ausfällen führt. Deshalb wird weltweit gegen diese Infektion mit Tot- und/oder Lebendimpfstoffen geimpft.

Das Segment A des IBDV kodiert in einem großen Leserahmen (ORF) für ein Polyprotein, welches ko- und posttranslational in einem autokatalytischen Prozess in die viralen Proteine (VP) 2, VP4 und VP3 durch die virale Protease VP4 (Birghan et al., 2000) gespalten wird. Das VP2 des IBDV ist nach dem heutigen Kenntnisstand das einzige Protein des IBDV, das neutralisierende Antikörper induzieren kann. Darüber hinaus kodiert das Segment A in einem zweiten, den ersten partiell überlappenden ORF (Spies et al., 1989) für das Nichtstrukturprotein VP5 (Mundt et al., 1995). Das kleinere Segment B kodiert in einem einzigen offenen Leserahmen für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (von Einem et al., 2004). Für die Etablierung des RGS war es unerlässlich, die vollständigen Sequenzen beider Segmente zu analysieren (Mundt und Müller, 1995). Damit konnte das erste RGS für *Birnaviridae* etabliert werden (Mundt und Vakharia, 1996). Dafür wurde jeweils am 5'-Ende des Positivstranges beider Segmente die Promotorsequenz für die DNA-abhängige RNA-Polymerase des T7-Phagen (T7-Promotor) mittels eines Oligonukleotids angefügt. Die Verwendung dieses Promotors zur Transkription infektiöser viraler cRNA wurde durch van der Werf et al. (1986) beim Poliovirus etabliert. Das 3'-Ende der birnaviralen cDNA wurde durch einen Spaltort einer Restriktionsendonuklease definiert, der keine (Segment B) oder nur wenige zusätzliche (Segment A) nicht-virale Nukleotide nach der Linearisierung zurückließ. T7-Promotor-Sequenz am 5'- Ende und Restriktionspaltort am 3'-Ende flankierten die vollständigen cDNA-Kopien der Segmente A und B (Mundt and Vakharia, 1996). Die viralen cDNA-Konstrukte beider Segmente wurden in einen bakteriellen Vektor kloniert und nach Linearisierung der cDNA wurde diese mittels der T7-Polymerase in virale plusstrangige und mit einer CAP-Struktur versehene cRNA transkribiert. Für die Transfektion der viralen cRNA in eukaryonte Zellen wurde ein auf Liposomen basierendes System genutzt. Damit konnte infektiöses, rekombinantes IBDV aus den klonierten Genomsegmenten generiert werden (Abb. 1).

Dieses RGS wurde genutzt, um die Bedeutung des VP5 für die virale Replikation *in vitro* zu untersuchen (Mundt et al., 1997) und damit einen Impfstoffkandidaten zur Nutzung als Markerimpfstoff zu etablieren. Weiterhin wurde untersucht, ob der unterschiedliche Pathotyp beider Serotypen in den nichtkodierenden Regionen des Segments A (Schröder et al., 2000) oder im VP5 (Schröder et al., 2001) begründet liegt. Innerhalb der Serotyp 1-Stämme sind zwei große Gruppen des IBDV vertreten. Diese umfassen einerseits solche IBDV, die Zellkulturen und proliferierende B-Lymphozyten infizieren können (ZK-IBDV) und andererseits solche IBDV, die nur proliferierende B-Lymphozyten infizieren (BL-IBDV). Für die Fähigkeit des IBDV, Zellkulturen zu infizieren, ist der Austausch zweier (Q253H, A284T) oder bei bestimmten Stämmen nur einer Aminosäure (A284T) im VP2 notwendig (Mundt, 1999). Damit konnten zielgerichtet IBDV-Stämme an die Zellkultur adaptiert werden.

Ein wesentlicher Aspekt bei der Impfstoffentwicklung ist es, dass die zu entwickelnden Impfstoffe dem Wirt möglichst nicht schaden (hoher Grad der Attenuierung), aber dem Impfling einen größtmöglichen Impfschutz verleihen.

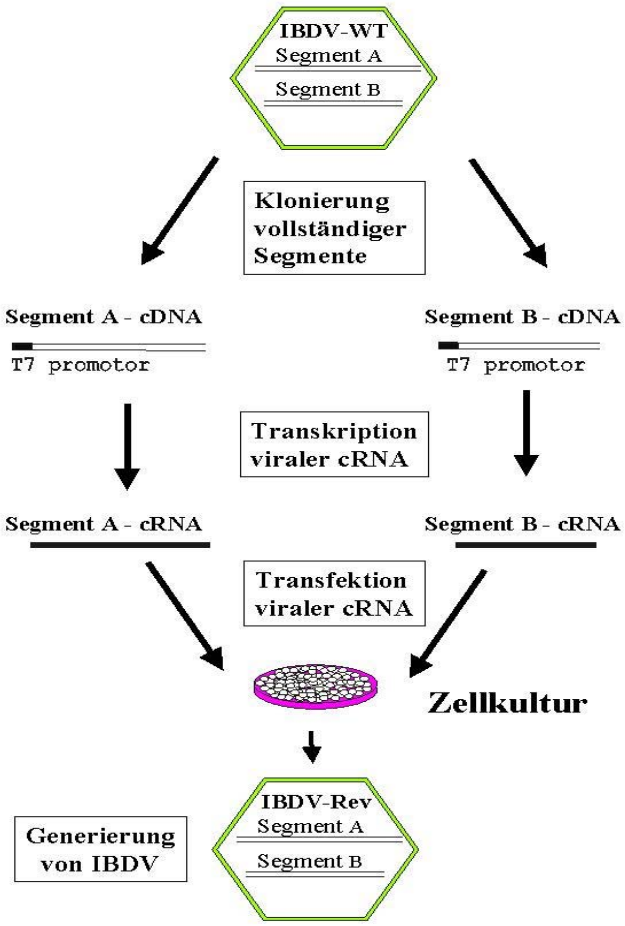


Abb. 1 : Grundprinzip eines reversen genetischen Systems des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV, Mundt and Vakharia, 1996). Die virale doppelsträngige genomische RNA beider Segmente (A und B) eines Wildtyp-IBDV (IBDV-WT) wird vollständig in cDNA transkribiert und anschließend in einen bakteriellen Vektor kloniert. Die virale cDNA wird mittels der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des Promotors des T7-Phagen in plussträngige cRNA transkribiert und in empfängliche Zellkulturen transfiziert. Dort erfolgt nach der Replikation die Freisetzung der Virusnachkommenschaft (IBDV-Rev).

Bis Mitte der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden IBDV-Feldstämme isoliert, die sich in ihrer Virulenz und ihrem antigenen Profil ähnelten. Dann traten in Europa plötzlich IBDV-Stämme auf, die sich bezüglich der Virulenz, aber nicht bezüglich ihrer Antigenität erheblich von den davor bekannten Isolaten unterschieden. Diese Stämme waren hoch virulent und konnten hohe maternale Antikörpertiter durchbrechen. Sie wurden „very virulent“ IBDV (vvIBDV) genannt und sind heute weltweit, außer in Nordamerika, verbreitet. Diese vvIBDV gehören alle zu der Gruppe der BL-IBDV. Um zu überprüfen, ob sich ein solcher Stamm als Impfstoff eignet, wurde der vvIBDV-Stamm UK661 (Brown and Skinner, 1996) vollständig kloniert und mittels molekularbiologischer Methoden und unter Nutzung der reversen Genetik zielgerichtet ein zellkulturadaptiertes IBDV generiert (van Loon et al, 2002). Dafür wurde dem von Mundt (1999) beschriebenen Verfahren gefolgt. Für eine Zellkulturadaptation war der Austausch einer Aminosäure (A284T) ausreichend. Darüber hinaus wurden aber noch weitere Aminosäuren ausgetauscht (Q253T, A279T), um die Replikationseffizienz zu steigern. Die experimentelle Infektion von SPF-Küken ergab, dass das mittels der reversen Genetik erzeugte Wildtypvirus in der Virulenz dem Elternvirus entsprach. Ein an die Zellkultur adaptiertes vvIBDV war im Küken erheblich attenuiert und induzierte eine

Immunität, die vor einer Belastungsinfektion sicher schützte. Damit wurde gezeigt, dass der Aminosäureaustausch im VP2 zur Attenuierung des Virus führte und damit molekular-virologische Werkzeuge zur Verfügung stehen, um ein IBDV an die Zellkultur effizient zu adaptieren und damit für das Küken zu attenuieren.

Das Auftreten von veränderten IBDV-Stämmen (vvIBDV) in Europa zeigt die fortlaufende virale Evolution. Parallel dazu wurden auch in den USA IBDV isoliert, die sich von den bis dahin isolierten Stämmen unterschieden (Rosenberger et al., 1985, Saif, 1984). Diese Stämme zeichneten sich dadurch aus, dass zwar auch hier infolge einer nahezu vollständigen Depletion der proliferierenden B-Lymphozyten eine humorale Immunsuppression erfolgte. Dabei wurde aber im Vergleich zu den bis dahin beschriebenen Isolaten histologisch eine sehr stark verminderte Entzündung beobachtet. Deshalb wurden diese IBDV-Stämme auch als Variantstämme bezeichnet. Die bis dahin als Impfstoff verwendeten IBDV, nun als klassische Stämme bezeichnet, erzeugten keinen umfassenden Schutz gegen diese Variantstämme. Darüber hinaus wurde durch Snyder et al. (1988) gefunden, dass neben dem veränderten klinischen Bild auch ein anderes antigenes Muster bezüglich der neutralisierenden Antikörper zu beobachten war. Damit bestand die Notwendigkeit der Entwicklung einer Vakzine, die sowohl gegen die klassischen Stämme als auch gegen die Variantstämme des IBDV einen Schutz induzieren sollte. Da auf natürlichem Wege der Zellkulturadaptation bisher kein solcher Impfstamm zur Verfügung stand, sollte mittels der reversen Genetik versucht werden, einen entsprechenden Breitspektrum-Impfstoff zu etablieren. Dafür wurde die kodierende Region des VP2 eines klassischen Impfstammes (D78) durch die des Variantstammes E/Del ausgewechselt. Dieses chimäre Virus (D78-E/Del) war infektiös. Anschließend wurde D78-E/Del mittels ortsgerichteter Mutagenese nach dem oben beschriebenen Verfahren (Q253H, A284T) an die Zellkultur adaptiert (D78-E/Del-QH-AT). Allerdings ergaben Tierversuche, dass dieses Virus noch nicht ausreichend attenuiert war (siehe Tabelle1). Darüber hinaus war zu beobachten, dass D78-E/Del-QH-AT in der Zellkultur nur zu niedrigen Virustitern (10^3 bis 10^4 $TCID_{50}$/ml) replizierte.

Tabelle 1: Vergleich der Virulenz von zwei rekombinanten IBDV

Virus [a]	Tage nach Infektion	
	3d	7d
D78-E/Del	0/2/3/0/0[b]	5/5/5/5/5
D78-E/Del-QH-AT	4/3/3/5/3	5/5/5/5/5
Nicht infiziert	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0

[a] SPF-Küken wurden mit einer Dosis von 10^2 EID_{50} (D78-E/Del) bzw. 10^4 $TCID_{50}$ (D78-E/Del-QH-AT) infiziert

[b] histopathologische Veränderungen in der Bursa Fabricii an einer Skala von 0 (keine Veränderungen) bis 5 (Bursafollikel vollständig zerstört)

Deshalb wurde versucht, dieses Virus besser an die Zellkulturreplikation zu adaptieren, in der Hoffnung, dass damit auch eine bessere Attenuierung im Küken erfolgte. Dafür wurden die zwischen dem klassischen Stamm und dem Variantstamm in diesem Bereich unterschiedlichen Aminosäuren (254, 270) in verschiedenen Kombinationen ausgetauscht und entsprechende Viren generiert. Nach Untersuchungen in der Zellkultur wurde ein Virus (D78-Q253H-S254G-A284T, im Folgenden als D78-Chim bezeichnet) ausgewählt, welches zu Titern in der Zellkultur replizierte, die denen klassischer Impfstämme entsprachen (Mundt et al., 2003). Im Tierversuch zeigte D78-Chim eine mit dem klassichen Impfstamm D78

vergleichbare Attenuierung. Damit waren zwei Voraussetzungen für einen Impfstoff – ausreichend hoher Titer in der Zellkultur und Attenuierung im Küken – erfüllt. Die nächste zu beantwortende Frage war, ob D78-Chim eine Immunantwort induzierte, die sowohl einen klassischen als auch einen Variantstamm vergleichbar neutralisiert. Seren von Küken, die mit dem klassischen Stamm D78 vakziniert waren, neutralisierten wie erwartet den homologen klassischen Stamm besser als den heterologen Variantstamm. Im Gegensatz dazu neutralisierten Seren von mit dem D78-Chim vakzinierten Küken sowohl den klassischen als auch den varianten Stamm mit vergleichbarer Effizienz. Es wurde also ein breiteres Spektrum an neutralisierenden Antikörpern induziert als mit dem klassischen Stamm D78. D78-Chim vermittelte auch einen ausreichenden Schutz gegenüber einer Belastungsinfektion sowohl mit einem klassischen als auch mit einem Variantstamm.

Es waren aber noch weitere Bedingungen zu erfüllen. Unter Feldbedingungen werden Elterntiere nach einem bestimmten Impfregime gegen IBDV vakziniert, um einen maternalen Schutz mittels Antikörper auf die Küken zu übertragen. Das Problem dabei ist, dass der verwendete IBDV-Lebendimpfstoff bei Küken mit einem zu hohen maternalen Antikörpertiter durch diesen neutralisiert wird und somit keine aktive Immunität induzieren kann. Deshalb wurde untersucht, ob und bei welchem maternalen Antikörpertiter ein aktiver Immunschutz induziert wurde. Dabei wurde festgestellt, dass D78-Chim und der klassische Impfstamm D78 in vergleichbarem Umfang und bei vergleichbaren maternalen Antikörpertitern einen aktiven Impfschutz induzieren konnten. Weitere Untersuchungen bezüglich der genetischen Stabilität dieses rekombinanten IBDV sind notwendig. Des Weiteren muss untersucht werden, ob dieses Virus nach Kükenpassagen eine Virulenzsteigerung erfährt.

Diese Beispiele zeigen, wie moderne Methoden der Molekularbiologie und Gentechnik erfolgreich bei der Entwicklung wirksamer Impfstoffe angewendet werden. Langwierige, ungerichtete Verfahren der Zellkulturadaptation und Attenuierung wurden hier durch eine zielgerichtete Mutagenese ersetzt. Grundlage für diese Entwicklung ist ein umfassendes Verständnis der Molekularbiologie der Erreger, was eine der Widmungsaufgaben des Instituts für Molekularbiologie darstellt.

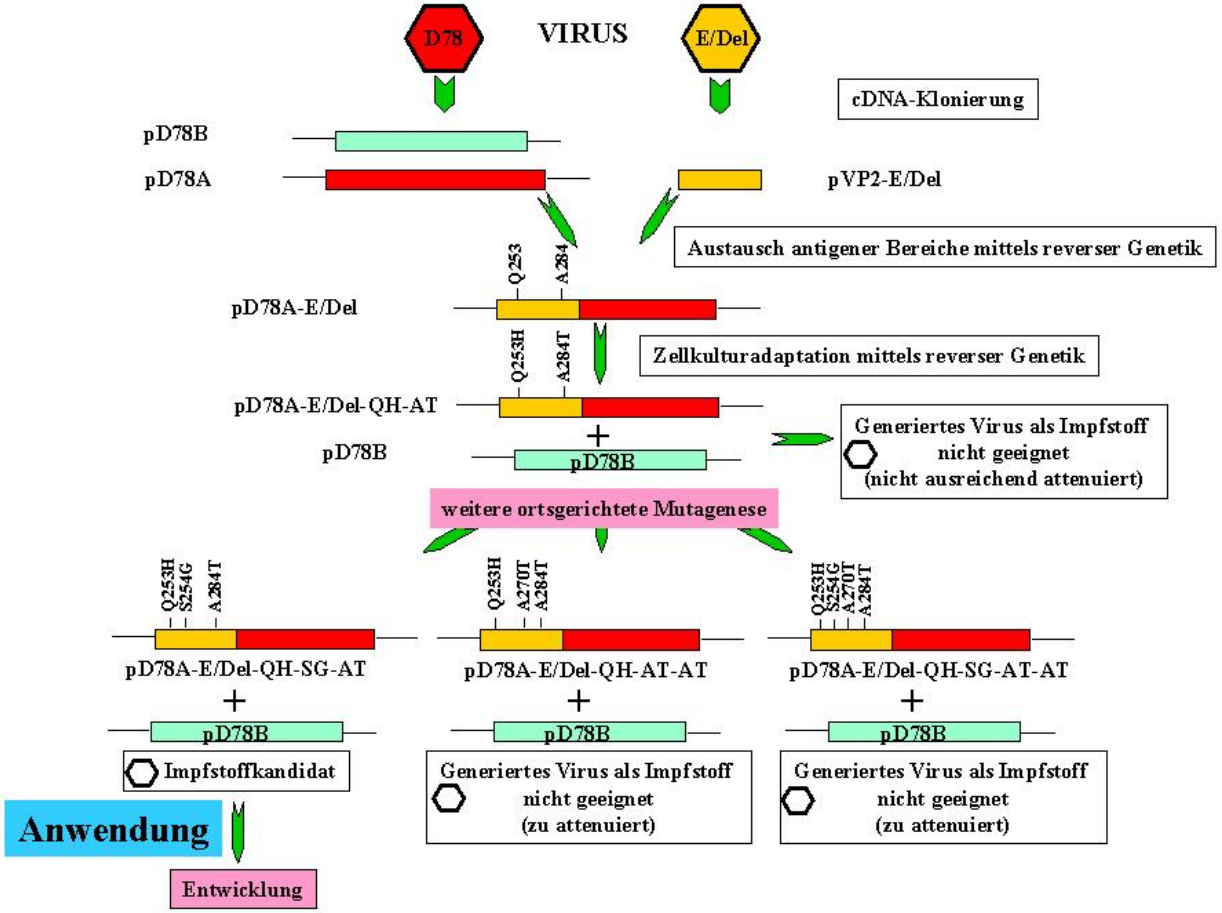


Abb. 2: Erzeugung eines attenuierten Breitspektrum-IBDV-Impfstoff mittels molekular-virologischer Methoden. Die Genomsequenzen des klassischen Impfstammes D78 und des VP2 des Variantstammes E/Del wurden als komplementäre DNA (cDNA) kloniert. Die Sequenzen des VP2 des Stammes D78 wurden mit denen des Variantstammes E/Del ausgetauscht. Anschließend wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese verschiedene Aminosäuren (in der Einbuchstaben-Kodierung angegeben) ausgetauscht. Diese wurden sowohl in der Zellkultur als auch im Tierversuch getestet. Ein Impfstoffkandidat (D78A-E/Del-QH-SG-AT) befindet sich in der Weiterentwicklung.

Literatur

BIRGHAN, C., MUNDT, E., und GORBALENYA, A. E.: A non-canonical Lon proteinase deficient of the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to impose broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. EMBO J., **19**, 114-123, 2000.

BROWN M.D., und SKINNER M. A.: Coding sequences of both genome segments of a European 'very virulent' infectious bursal disease virus.Virus Res., **40**, 1-15, 1996.

DELMAS, B., KIBENGE, F. S. B., LEONG, J. C., MUNDT, E., VAKHARIA, V. N. und WU, J. L. (2004). *Birnaviridae*. In: *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball, eds), 561-569. Elsevier/Academic Press, London.

MUNDT, E.: Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. J. Gen. Virol., **80**, 2067-2076, 1999.

MUNDT, E., BEYER, J., und MÜLLER, H.: Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease infected cells. J. Gen. Virol., **76**, 437-443, 1995.

MUNDT, E., DE HAAS, N, und VAN LOON, A. A. W. M.: Development of a vaccine for immunization against classical as well as variant strains of infectious bursal disease virus using reverse genetics. Vaccine, **21**, 4616-4624, 2003.

MUNDT, E., KÖLLNER, B., und KRETZSCHMAR, D.: VP5 of infectious bursal disease virus (IBDV) is not essential for viral replication in cell culture. J. Virol., **71**, 5647- 5651, 1997.

MUNDT, E., und MÜLLER, H.: Complete nucleotide sequences of 5'- and 3'- noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. Virology, **209**, 209-218, 1995.

MUNDT E., und VAKHARIA V.N.: Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 11131-11136, 1996.

RACANIELLO, V. R., und BALTIMORE, D.: Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. Science, **214**, 916-919, 1981.

ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S., und METZ A.: Use of infectious bursal disease virus variant vaccines in broilers and broiler breeders. Proc. West. Poult. Dis. Conf., **36**, 105-109, 1987.

SAIF, Y.M. (1984). Infectious bursal disease virus type. Proc. 19th Natl. Meet. On Poultry Health and Condemnations. Ocean City, Md, 105-107.

SCHRÖDER, A., VAN LOON, A. A. W. M., GOOVAERTS, D., und MUNDT, E.: Chimeras in noncoding regions between serotypes I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens. J. Gen. Virol., **81**, 533-540, 2000.

SCHRÖDER, A., VAN LOON, A. A. W. M., GOOVAERTS, D., TEIFKE, J. P., und MUNDT, E.: VP5 and the N terminus of VP2 are not responsible for the different pathotype of serotype I and II infectious bursal disease virus. J. Gen. Virol., **82**, 159-169, 2001.

SNYDER, D. B., LANA, D. P., SAVAGE, A. P., YANCEY, F. S., MENGEL, S. A. und MARQUART, W. W.: Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis., **32**, 535-539, 1988.

SPIES, U., MÜLLER, H. und BECHT, H.: Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus segment A delinates two major open reading frames. Nucleic Acids Res., **17**, 7982, 1989.

TANIGUCHI, T., PALMIERI, M., und WEISSMANN, C.: Qβ DNA-containing hybrid plasmids giving rise to Qβ phage formation in the bacterial host. Nature, **274**, 223-228, 1978.

VAN DER WERF, S., BRADLEY, J., WIMMER, E., STUDIER, F. W., und DUNN, J. J.: Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 2330-2334, 1986.

VON EINEM, U. I., GORBALENYA, A. E., SCHIRRMEIER, H., BEHRENS, S. E., LETZEL, T. und MUNDT, E.: VP1 of Infectious Bursal Disease Virus is a RNA-Dependent RNA Polymerase. J. Gen. Virol., **85**, 2221-2229, 2004.

VAN LOON, A.A.W.M., DE HAAS, N., ZEYDA, I., und MUNDT, E.: Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. J. Gen. Virol., **83**, 121-129, 2002.

2 INSTITUT FÜR VIRUSDIAGNOSTIK: NEUE WEGE IN DER SCHWEINEPESTBEKÄMPFUNG BEI HAUSSCHWEINEN – EIN AUF ERREGERNACHWEIS UND IMPFUNG GESTÜTZTES TIERSEUCHENBEKÄMPFUNGSKONZEPT

Depner, K.*, Hoffmann, B., Beer, M., Teuffert, J., Kaden, V., Schirrmeier, H. und Mettenleiter, T.

I Einleitung

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine der wirtschaftlich folgenschwersten Tierseuchen weltweit und nimmt unter den Schweinekrankheiten als anzeigepflichtige Tierseuche eine zentrale Stellung ein. Die KSP wird in erster Linie bekämpft, weil sie den freien Handel mit Schweinen bzw. Schweinefleisch behindert. Um diese Handelsbarrieren zu beseitigen, wurde Ende der 70er Jahre in der Europäischen Union (EU) beschlossen, die KSP zu tilgen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde 1980 eine Strategie eingeführt, die konsequent die Impfung verbietet und das Keulen als Hauptbekämpfungsmaßnahme vorschreibt. Diese Strategie wurde als einzig praktikabler Weg angesehen, der die Liberalisierung des Handels und die Errichtung eines gemeinsamen Binnenmarktes garantiert. In letzter Konsequenz bedeutet es aber, dass ein Land oder eine Region nur dann den Status der KSP-Freiheit bei Hausschweinen erlangen kann, wenn die Hausschweinepopulation sowohl frei von KSP-Virus als auch von Antikörpern gegen das KSP-Virus ist. Die Freiheit von Antikörpern wurde deshalb verlangt, weil hinsichtlich der Freiheit von KSP-Virus kein diagnostischer Test zur Verfügung stand, der bei ausreichender Spezifität und Sensitivität für Massenuntersuchungen geeignet war.

Die allgemeinen Bekämpfungsmaßnahmen in der EU bei Hausschweinen können wie folgt zusammengefasst werden:

- Keulen aller Schweine im Seuchenbetrieb,
- Einrichtung von Sperrbezirken und Beobachtungsgebieten,
- Transportverbote, Handelsrestriktionen,
- umfangreiche epidemiologische, klinische, serologische und virologische Untersuchungen.

Zusätzlich können noch je nach Seuchenlage das prophylaktische Keulen aller Schweine im 500- bis 1.000-m-Umkreis eines Seuchenherdes sowie die Notimpfung als spezielle Bekämpfungsmaßnahmen eingesetzt werden. Das Keulen im 1.000-m-Radius wurde sowohl in Deutschland als auch in den Niederlanden während der letzten Seuchenzüge durchgeführt. Die Notimpfung wurde bei Hausschweinen allerdings wegen strenger Auflagen seitens der EU noch nie eingesetzt.

Als sehr umstritten haben sich diese Bekämpfungsmaßnahmen in schweinedichten Gegenden erwiesen. Die Tötung vorwiegend gesunder Tiere wird aus ethischen und tierschützerischen Gründen von der Bevölkerung immer weniger akzeptiert. Weiterhin schwindet beim Verbraucher das Verständnis für die Nicht-Impfpolitik, zumal die Impfung keine negativen Effekte für Tiere und Menschen hat. Aus der früheren Anwendung der Impfung ergeben sich zudem keine Beweise für eine Persistenz von KSP-Virus bei geimpften Schweinen.

Die jetzige Bekämpfungsstrategie basiert auf folgenden Annahmen:

- Nur von seronegativen (antikörperfreien) Schweinen geht keine KSP-Gefahr aus, denn nur antikörperfreie Schweine erlauben eine effiziente Diagnostik, die sichere KSP-Freiheit garantiert.
- Von seropositiven Schweinen kann eine Gefahr ausgehen, daher müssen diese eliminiert werden. Seropositive Tiere stören das bisherige System der Dokumentation der Seuchenfreiheit in virusfreien Populationen und müssen daher gekeult werden.
- Da mit konventionellem Impfstoff gegen KSP geimpfte Schweine seropositiv sind, müssen diese ebenfalls gekeult werden.
- Eine konventionell geimpfte Schweinepopulation gilt nicht als KSP-frei, solange seropositive Tiere nachweisbar sind.
- Seuchenfreiheit wird durch die KSP-Antikörperfreiheit einer ganzen Population definiert.
- Die KSP-Impfung stört das bisherige System.
- Das schnelle Keulen möglichst vieler „verdächtiger“ oder „empfänglicher“ Tiere stoppt die Weiterverbreitung.

Als Folge der aufgelisteten Annahmen wird auch für virusfreie Regionen die KSP-Antikörperfreiheit gefordert, um damit den Status der KSP-Freiheit zu belegen. Die serologischen Nachweise sind somit entscheidend dafür, ob ein Land oder eine Region als seuchenfrei eingestuft wird und somit frei handeln kann. Der direkte Erregernachweis spielt nur während der Seuchenfeststellung und Seuchentilgung eine primäre Rolle.

Schlussfolgerungen

Die zur Zeit praktizierte Strategie der KSP-Bekämpfung ist mittlerweile über 20 Jahre alt. In diesem Zeitraum haben zwei wesentliche Veränderungen stattgefunden, die Überlegungen zu einer neuen Bekämpfungsstrategie rechtfertigen:

1. Die Akzeptanz der aktuellen Bekämpfungsmaßnahmen ist bei der Bevölkerung aufgrund der massenhaften Keulungen, die aus ökonomischen Gründen durchgeführt werden, nicht mehr gegeben. Es sind vor allem ethische und tierschützerische Aspekte, die diese Bekämpfungsmaßnahmen in Frage stellen.

2. Es wurden wesentliche Fortschritte auf dem Gebiet der KSP-Forschung erzielt. Sowohl neue diagnostische Verfahren (*real-time* RT-PCR, Marker-ELISA) als auch moderne Impfstoffe (Markerimpfstoffe) wurden entwickelt.

Die Voraussetzungen für neue Wege in der Seuchenbekämpfung sind gegeben.

II Verbesserungsmöglichkeiten der jetzigen Bekämpfungsstrategie

Die wünschenswerte Bekämpfungsstrategie muss ethisch vertretbar, kostengünstig, schnell und mit hoher Sicherheit die Erregerfreiheit **direkt** bestätigen. Voraussetzung dafür ist, dass innerhalb des Bekämpfungssystems der direkte Erregernachweis einen neuen Stellenwert erhält. Diese Forderung konnte bislang nicht erfüllt werden, da die verfügbaren direkten Nachweisverfahren (Virusisolierung und Antigen-ELISA) dazu nicht in der Lage sind.

Mit der quantitativen **Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR)** steht zum ersten Mal ein Nachweisverfahren für die direkte KSP-Diagnostik zur Verfügung, welches das Potenzial besitzt, die alten Verfahren zu ergänzen bzw. unter bestimmten Voraussetzungen zu ersetzen. Die Sensitivität der RT-PCR ist zumindest gleich wie die der Virusisolierung (Goldstandard). Sie ist KSP-spezifisch; verwandte Pestiviren werden nicht detektiert. Die Testdauer von einem Tag ist der von ELISA-Systemen vergleichbar. Kommerziell erhältliche RNA-Extraktionsautomaten und Pipettierroboter können den Einsatz in der Massenuntersuchung ermöglichen. Aufgrund der hohen Sensitivität können zudem mehrere Proben gepoolt untersucht werden, so dass die Kosten niedrig gehalten werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die *real-time* RT-PCR die Schnelligkeit der Antigen-ELISAs und die Sensitivität der Virusisolierung vereint. Sie eröffnet somit neue diagnostische Möglichkeiten und ermöglicht neue Wege in der Seuchenbekämpfung.

Vorerst erscheint eine Ergänzung der KSP-Bekämpfungsstrategien durch die RT-PCR besonders für den Ausbruchsfall und die jeweils betroffene, umgrenzte Region sinnvoll. Erfolg versprechende Ansätze bieten dabei besonders Modelle, die in schweinedichten Gegenden im Seuchenfall eine schnell wirksame Impfung mit dem sensitiven und schnellen Erregernachweis kombinieren.

III Die erweiterte Bekämpfungsstrategie

Durch Erweiterung des Schwerpunktes der Untersuchungen vom Antikörpernachweis auf den Erregernachweis mittels RT-PCR entsteht folgende neue Bekämpfungsphilosophie:

- Definition der Seuchenfreiheit ist zukünftig auch anhand der Erregerfreiheit möglich.
- Überwachung und Zertifizierung der Erregerfreiheit ist unter definierten Bedingungen auch mittels *real-time* RT-PCR zulässig.
- Gezielter Einsatz von Impfung und Erregernachweis im Seuchenfall ist denkbar, um die unnötige Tötung gesunder, virusfreier Tiere zu verhindern.

Anwendung der erweiterten Strategie:

- Im Seuchenfall: Nachweis der Seuchenfreiheit mittels real-time RT-PCR nach Tötung der infizierten Schweine/Bestände (Aufhebungsuntersuchung) in geimpften Populationen sowie Ergänzung zur serologischen Überwachung in nicht geimpften Populationen (Virusnachweis ist früher möglich als Antikörpernachweis).
- Bei Seuchenfreiheit: Kontrolle der Seuchenfreiheit mittels RT-PCR in geimpften Populationen als Ergänzung zur serologischen Überwachung in nicht geimpften Populationen.

Wegen der hohen Sensitivität und Spezifität der *real-time* RT-PCR-Methode ist davon auszugehen, dass bei dieser Bekämpfungsstrategie und geeigneter Wahl des Untersuchungszeitpunktes und des Stichprobenumfangs kein höheres diagnostisches Risiko entsteht als bisher. Das System würde sogar zusätzliche Sicherheit bieten, da schnell und sicher direkt nach dem Erreger gesucht werden kann. Impfmaßnahmen würden in den betroffenen Gebieten (Sperrbezirk und Beobachtungsgebiet) als zusätzliches Bekämpfungsmittel die Seuchenüberwachung nicht negativ beeinflussen. Eine massenhafte Keulung der Tiere in schweinedichten Gegenden würde verhindert, denn es wären nur die Herden von Keulungsmaßnahmen betroffen, in denen KSP-Virus nachgewiesen wurde. Alle

Schweinebetriebe, für die Erregerfreiheit nach RT-PCR-Untersuchung zertifiziert wird, könnten nach Einhaltung bestimmter Sicherheitsfristen als KSP-Virus-frei eingestuft werden.

Zusammengefasst:

- Eine erweiterte Bekämpfungsstrategie, die den direkten Erregernachweis mittels *real-time* RT-PCR nutzt, führt zu keinem höheren Seuchenrisiko als die jetzige Strategie.
- Impfmaßnahmen wären als zusätzliches Bekämpfungsmittel im Seuchenfall durchführbar und sollten als wichtiger Bestandteil integriert werden. Die Impfung kann dabei mit attenuierten Lebendvakzinen erfolgen.
- Beim Einsatz von markierten Vakzinen kann die *real-time* RT-PCR parallel zu einer DIVA-Strategie *(Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) eingesetzt werden.
- Es würden in der Regel nur Herden gekeult werden, in denen ein Ausbruch festgestellt wurde. Das Keulen eines Großteils der Tiere würde entfallen. Durch den erleichterten Einsatz der Impfung könnte die Ausbreitung der KSP wesentlich eingeschränkt werden.
- Zertifizierte Erregerfreiheit nach *real-time* RT-PCR-Untersuchung würde das Schlachten der Schweine und den freien (eventuell regionalisierten) Handel mit Schweinefleisch ermöglichen, unabhängig von der allgemeinen KSP-Situation im Land.
- Serologische Nachweisverfahren können für die Überwachung des Status bei einer Nicht-Impfpolitik oder einer Impfstrategie mit Markerimpfstoffen weiterhin eingesetzt werden. Aufgrund ihres retrospektiven Überwachungspotenzials werden serologische Verfahren weiterhin eine große Bedeutung für die Kontrolle des Status KSP-frei haben.

IV Die praktische Umsetzung

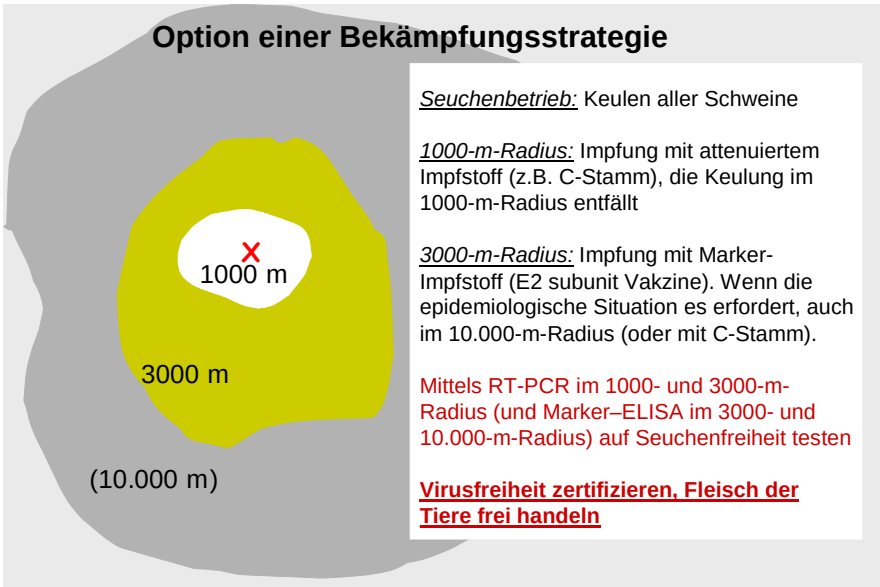
Abhängig von der Seuchensituation und von der Art des Betriebes ist die Frage zu beantworten, wie oft und wie intensiv eine Herde bzw. eine Schweinepopulation innerhalb einer definierten Region mittels RT-PCR untersucht werden muss. Das Vorgehen richtet sich nach dem Risiko einer Region bzw. Herde, sich mit KSP-Virus zu infizieren. Beispielsweise könnte in einer schweinedichten Gegend im Falle eines KSP-Ausbruchs wie folgt vorgegangen werden:

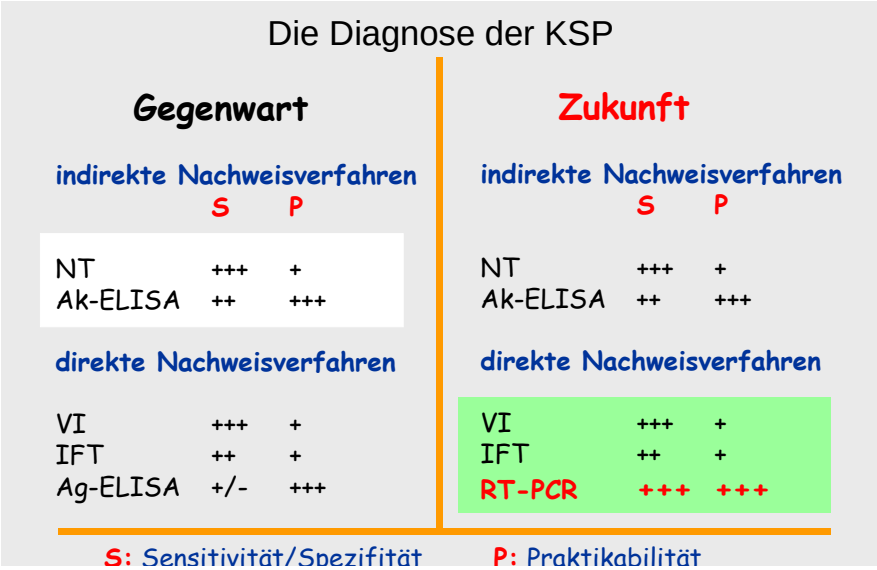
- Keulen aller Schweine im Seuchenbetrieb,
- im 1.000-m-Radius Impfung mit attenuiertem Impfstoff (z. B. C-Stamm); die Keulung im 1.000-m-Radius entfällt,
- im 3.000-m-Radius Impfung mit Marker-Impfstoff (E2 subunit Vakzine) oder attenuiertem Lebendimpfstoff; wenn die epidemiologische Situation es erfordert, Impfung auch im 10.000-m-Radius,
- mittels *real-time* RT-PCR im 1.000- und 3.000-m-Radius (und eventuell Marker–ELISA im 3.000-m- bzw. 10.000-m-Radius) auf Seuchenfreiheit testen,
- Virusfreiheit zertifizieren, Tiere verwerten und Erzeugnisse frei handeln.

V Offene Fragen

Die hier vorgestellte Vorgehensweise kann nur der Anfang eines Umdenkprozesses in der Seuchenbekämpfung der KSP sein. Es gibt noch offene Fragen, die direkt die *real-time* RT-PCR als diagnostische Methode sowie das gesamte Bekämpfungsmodell selbst betreffen.
Da die RT-PCR eine extrem sensitive Methode ist, können Kontaminationen zu falsch positiven Ergebnissen führen. Modalitäten zur Abklärung unklarer bzw. zweifelhafter PCR-Befunde müssen erarbeitet werden. Des Weiteren ist das Problem der Automatisierbarkeit der *real-time* RT-PCR nicht endgültig geklärt. Neue Automaten, die vermehrt kommerziell

angeboten werden, sind für den gewünschten Einsatz noch nicht getestet und validiert. Ein wichtiger noch zu klärender Punkt ist die Größe der Probenpools. In eigenen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass zehn Proben gepoolt werden können, ohne ein erhöhtes diagnostisches Risiko einzugehen.
Was das Bekämpfungsmodell als solches betrifft, gilt es noch zu klären, unter welchen Umständen die KSP-(Marker)-Impfung als zusätzliche Bekämpfungsmethode in die Bekämpfungsstrategie eingebunden werden kann. Es wäre denkbar, dass in Betrieben mit hohem KSP-Risiko parallel zu einer RT-PCR-Überwachung die Impfung eingesetzt werden kann. Des Weiteren kommen auch alternative Impfmodelle in Frage (z. B. eine schnelle orale Immunisierung der Hausschweine mit einem in der Entwicklung befindlichen Marker-Lebendimpfstoff), die noch experimentell geprüft werden müssen.
Zudem sollten epidemiologische Modellrechnungen an verschiedenen Ausbruchsszenarien durchgeführt werden. Dies könnte dann zur Auswahl der jeweils optimalen Strategie führen.





NT: Neutralisationstest, VI: Virusisolierung, IFT: indirekte Immunfluoreszenz

INSTITUT FÜR INFEKTIONSMEDIZIN:
DIE KOI HERPESVIRUS INFEKTION DER CYPRINIDEN – EINE NEUE FISCHSEUCHE

Fichtner, D.[1], Bergmann, S.M.[1], Dauber, M., [2], Fuchs, W.[3] und Granzow, H.[1]
[1]Institut für Infektionsmedizin; [2]Institut für Virusdiagnostik; [3]Institut für Molekularbiologie

1. Einleitung

Ende der 90er Jahre hat ein neues Virus Massensterben bei Kulturkarpfen *(Cyprinus carpio carpio)* und bei Koi-Karpfen *(Cyprinus carpio kio)* in Israel und in Westeuropa verursacht (Bretzinger et al., 1999, Neukirch et al.. 2000, Hedrick et al., 2000). Als Erreger wurde ein Herpesvirus isoliert, das später als Koi-Herpesvirus (KHV) bezeichnet wurde (Hedrick et al., 2000). Auch wurde diskutiert, das Virus analog zu bisher bekannten Herpesviren der Cypriniden als Cyprinid Herpesvirus-3 (CyHV 3) zu benennen (Hedrick, 2004). Eine Bezeichnung nach den von diesem Virus beim Fisch erzeugten Symptomen als „*Carp Nephritis and Gill Necrosis Virus*“ (CNGV) wurde ebenfalls vorgeschlagen (Ronen et al., 2003).
Die Krankheit zeigt sich klinisch manifest bei Wassertemperaturen zwischen 17 und 26 °C. Die Inkubationszeit beträgt, abhängig von der Wassertemperatur, 7 bis 21 Tage.
Die Morbidität beträgt bei hohen Temperaturen meist 100 %, die Mortalität etwa 90 %. Bei den erkrankten Fischen sind die wichtigsten Symptome Kiemenverfärbungen und –nekrosen (Abb. 1), Anorexie, Enophthalmus, Flossenerosionen, Hämorrhagien am Flossengrund, Dunkelfärbung, Flecken auf der Haut mit verstärkter oder reduzierter Schleimbildung (Haenen et al., 2004).

Abb. 1: Kieme eines erkrankten Kois mit umfangreichen Nekrosen
(Foto: Kleingeld, LAVES, Task-Force Veterinärwesen, FB Fischseuchenbekämpfung, Hannover)

Die KHV-Infektion wurde durch den unkontrollierten Handel mit infizierten Kois weltweit verbreitet und stellt zunehmend einen Risikofaktor für die Produktion von Nutzkarpfen dar.
Deshalb wurde in Deutschland und in der Europäischen Union die Einführung der Untersuchungs-, Melde- und Bekämpfungspflicht für Nutzfische, möglichst auch für den Handel mit Zierfischen, gefordert. In Deutschland erfolgt gegenwärtig eine Änderung der Fischseuchen-VO. Die KHV-Infektion soll in die Liste 2 der Aquakulturrichtlinie der EU der anzeige- und bekämpfungspflichtigen Krankheiten aufgenommen werden. Auch das Internationale Tierseuchenamt (O.I.E.) empfiehlt für die KHV-Infektion die Meldepflicht (Haenen et al., 2004).

Das Nationale Referenzlabor für Fischkrankheiten (NRL-F) am Friedrich-Loeffler-Institut hat sich nach den ersten Meldungen zum Auftreten dieser neuen Krankheit bei Nutzfischen mit der Diagnose und damit eng verbundenen wissenschaftlichen Fragestellungen beschäftigt.

2. Vorkommen und Bedeutung

Der erste Ausbruch der Krankheit bei Kulturkarpfen wurde im Mai 1998 an der Nordwestküste Israels beobachtet. Bis zum Ende des Jahres 2000 hat die Krankheit bis zu 90 % der Fischfarmen Israels erfasst und verursacht in der Aquakultur jährliche Kosten von 300 Mill. US$ (Perelberg et al., 2003). In den USA wurde die Krankheit erstmals Ende 1998 bei einem Koi beobachtet (Hedrick et al., 2000). Erste Berichte über „Massensterben“ bei Kulturkarpfen 1997 und 1998 in Deutschland stammten von Bretzinger et al. (1999) und Hoffmann (2000). In den Kiemen-Proben befallener Karpfen konnten elektronenmikroskopisch Herpesvirus-like Partikel nachgewiesen werden. Über die Isolierung von Herpesviren aus erkrankten Kois berichteten Neukirch und Kunz (2001). Der Nachweis von Genom des KHV in erkrankten Koi- und Kulturkarpfen sowie in Isolaten gelang 2002 (Bergmann und Fichtner, 2003). Das isolierte Virus war nach Analyse ausgewählter Polypeptid- und Genomabschnitte identisch mit dem Isolat aus Israel. In den Folgejahren wurde das KHV weltweit in zahlreichen Ländern nachgewiesen. Eine Auflistung der Situation erfolgte bei Haenen et al. (2004). Die Bedeutung des KHV als Erreger einer neuen Fischseuche unterstreichen zwei Ausbrüche in Deutschland. Im Sommer 2003 kam es zu einem Ausbruch in drei der größten Karpfen-Teichanlagen in Sachsen. Die Mortalität betrug zwischen 20 und 100 %. Die Gesamtverluste betrugen 48 t Karpfen. Der direkte Schaden wurde mit 130.000 € berechnet. Die Folgeschäden betrugen noch einmal 200.000 € (Bräuer und Herms, 2004). Ein weiterer KHV-Ausbruch 2004 wurde in einer großen Teichanlage in Thüringen festgestellt. 80 t Karpfen Verluste, direkter Schaden von 310.000 € und indirekter Schaden von 106.000 € wurden ermittelt (Bocklisch et al., 2004).

3. Morphogenesestadien des KHV in Zellkulturen

Für die elektronenmikroskopischen Ultradünnschnittuntersuchungen wurden Virusisolate und Referenzstämme auf Zellkulturen (common carp brain, CCB) angezüchtet und zu verschiedenen Zeiten post infectionem nach üblichen Methoden präpariert. Die infizierten Zellen zeigten zahlreiche Stadien einer Virusproduktion, wie sie für bisher untersuchte Herpesviren typisch sind. Dazu gehören vor allem Nukleokapsidbildung im Zellkern, primäre Umhüllung an der inneren Kernmembran und die sekundäre Umhüllung im Bereich des Golgi-Apparats. Morphogenetisch besonders auffällig war allerdings die vergleichsweise große Zahl im Zellkern bzw. Zytoplasma akkumulierter Nukleokapside. Dies führte zu zahlreichen pseudokristallinen Einschlüssen im Zellkern, die häufig aus inkompletten Nukleokapsiden bestanden.

Die große Anzahl produzierter Nukleokapside steht in deutlichem Widerspruch zur geringen Ausbeute an reifen Virusnachkommen. Dieses Missverhältnis dürfte auch die Beobachtung erklären, dass bei elektronenmikroskopischer Untersuchung der Virusanzüchtungen bzw. Organanreibungen infizierter Tiere im Negativkontrastverfahren nur sehr selten komplette Virionen nachzuweisen sind. Eine relativ hohe Empfindlichkeit kompletter Virionen gegenüber äußeren Einflüssen zeigt sich besonders im Nachweis zahlreicher ‚deformierter’ Nukleokapside, wie sie für andere Vertreter der *Herpesviridae* bisher nicht beschrieben wurden.

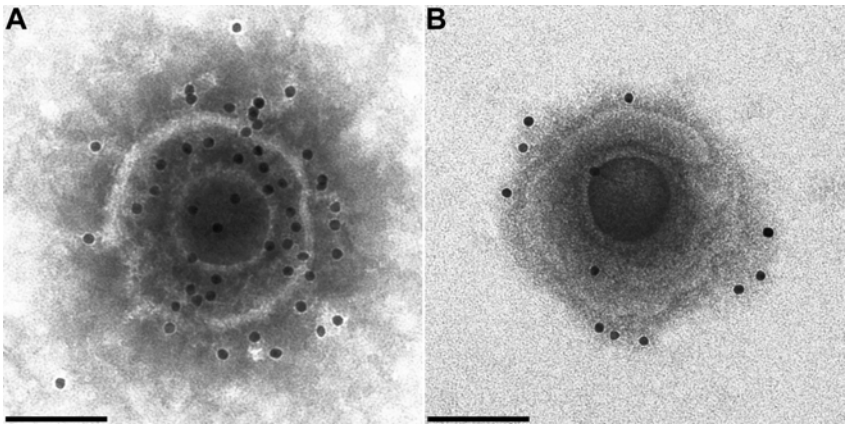


Abb. 2: A: Koi-HV markiert mit polyklonalem Hyperimmunserum und kolloidalem Gold (10 nm, GAR 10).
B: Koi-HV markiert mit monoklonalem Antikörper mab 11A4 und kolloidalem Gold (10 nm, GAM 10). Die Markerlänge entspricht 100 nm

4. Molekularbiologische Charakterisierung des KHV

Das doppelsträngige DNA-Genom des Koi Herpesvirus (KHV) ist mit etwa 290 kbp größer als die Genome aller anderen bisher bekannten Herpesviren. Obwohl angeblich bereits große Teile des Genoms charakterisiert worden sind, stehen der wissenschaftlichen Gemeinschaft in frei zugänglichen Datenbanken erst wenige kurze DNA-Sequenzen zur Verfügung. Einige dieser Sequenzen geben Hinweise auf die Funktion der möglicherweise codierten Virusproteine, die erkennbare Homologien zu Enzymen des Nukleinsäurestoffwechsels (Thymidinkinase, Ribonukleotid-Reduktase) sowie zur DNA-Polymerase, dem Hauptkapsid-protein und drei Membranproteinen des Ictalurid Herpesvirus 1 (IcHV-1) und des Ranid Herpesvirus 1 (RaHV-1) aufweisen, die als bislang einzige Herpesviren der Fische und Amphibien auf molekularer Ebene näher betrachtet wurden. Keines der drei Viren zeigt signifikante Sequenzhomologien zu den relativ gut untersuchten Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren der Säugetiere und Vögel, was auf einen beträchtlichen phylogenetischen Abstand von diesen Virusgruppen hindeutet. Die Erforschung der Genfunktionen und Replikationsmechanismen der Fisch-Herpesviren stellt deshalb eine wichtige Aufgabe für die virologische Grundlagenforschung dar, da Analogieschlüsse zu früheren Erkenntnissen nur in begrenztem Maße möglich sein dürften.

Darüber hinaus können molekularbiologische Untersuchungen zur Entwicklung sicherer und wirksamer Impfstoffe gegen KHV führen, entweder durch Expression immunrelevanter Virusproteine in geeigneten bakteriellen oder viralen Vektoren, oder durch Herstellung stabil attenuierter, rekombinanter Koi-Herpesviren mit definierten Gendeletionen, die als Lebendvakzinen geeignet sind. Durch die Identifizierung immunogener KHV-Genprodukte, deren Expression in pro- und eukaryontischen Zellen und die Herstellung monospezifischer Antiseren gegen die Expressionsprodukte könnten außerdem wertvolle Hilfsmittel für die Virusdiagnostik gewonnen werden.

Für die *in vitro* Vermehrung des KHV (erhalten von R. P. Hedrick, Davis, CA, USA) stehen uns zwei als KF-1 (erhalten von R. P. Hedrick, Davis, CA, USA) und CCB (erhalten von M. Neukirch, Hannover) bezeichnete Karpfenzelllinien zur Verfügung. Als Grundlage für unsere weiteren Arbeiten konnten wir aus den nach KHV-Infektion erhaltenen Lysaten dieser Zellen virale DNA isolieren, die nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen oder mechanischer Scherung durch Ultraschallbehandlung über verschiedene Vektoren in E. coli kloniert wurden. Bisher wurden jeweils etwa einhundert 0,5 – 8 kbp große Plasmidklone und Cosmidklone 40 – 50 kbp großer KHV-Genomfragmente isoliert, die zusammen genommen

das gesamte Virusgenom in überlappenden Abschnitten repräsentieren dürften. Mit Hilfe dieser Plasmide und Cosmide können veröffentlichte DNA-Sequenzen des KHV-Genoms überprüft und bislang unbekannte Genomabschnitte analysiert sowie die darin codierten Gene identifiziert werden.
Parallel dazu wurde eine ca. 5 x 10^4 Klone umfassende Expressionsbibliothek 0,8 – 1,5 kbp großer KHV-DNA-Fragmente in Lambda-Phagen generiert, die es ermöglichen soll, die viralen Zielproteine der verfügbaren monoklonalen Antikörper zu bestimmen, die in Western-Blot Analysen spezifische Reaktionen mit KHV-infizierten Zellkulturen zeigen (Abb. 3). Nach Expressionsklonierung eines der anhand der DNA-Sequenz postulierten Membranproteine des KHV (s.o.) in eukaryontischen Zellen konnten wir bereits spezifische Reaktionen mit einem experimentell hergestellten KHV-spezifischen Kaninchenantiserum (s.o.) nachweisen. Umgekehrt konnten wir ein virales Protein gleicher Größe in KHV-infizierten Zellen mit Hilfe eines monospezifischen Antiserums gegen das als bakterielles Fusionsprotein exprimierte KHV-Protein identifizieren (Abb. 4). Es soll nun geklärt werden, ob dieses KHV-Genprodukt auch für die Immunantwort im Karpfen relevant ist.
Ein weiteres wichtiges Ziel unserer Arbeit ist die Etablierung geeigneter Methoden zur gezielten Mutagnese des KHV-Genoms, da nur mit Hilfe rekombinanter Viren klare Erkenntnisse über die Funktion einzelner Virusgene gewonnen werden können. Gentechnisch hergestellte Viren mit definierten Gendeletionen können darüber hinaus auch als stabil attenuierte Lebendvakzinen bzw. als Markerimpfstoffe geeignet sein. Voraussetzung für deren Generierung ist die erfolgreiche Transfektion permissiver Zellen mit rekombinanter DNA. Erste Versuche mit Reportergen-Plasmiden zeigten, dass durch Lipofektion fremde DNA relativ effizient in CCB-Zellen eingebracht werden kann. Auch konnte nach Transfektion dieser Zellen mit isolierter KHV-DNA Virus reisoliert werden, was belegt, dass das KHV-Genom, wie die Genome anderer Herpesviren, unabhängig von viralen Strukturproteinen infektiös ist. Da jedoch die Virusausbeuten bei solchen Versuchen bislang noch sehr gering sind, verwenden wir zur Herstellung rekombinanter Koi-Herpesviren konventionell infizierte CCB-Zellkulturen, die anschließend mit Plasmiden transfiziert werden, welche subgenomische KHV-DNA Fragmente mit den gewünschten Mutationen enthalten. Für die Herstellung einer ersten KHV-Mutante wurde eine Expressionskassette für das grün fluoreszierende Protein (GFP) in das klonierte Gen der viralen Thymdinkinase so inseriert, dass auf beiden Seiten ausreichend lange virale DNA-Sequenzen für eine homologe Rekombination mit dem Virusgenom erhalten blieben. Dieser Insertionsort wurde gewählt, weil die Thymdinkinase-Gene aller anderen bislang untersuchten Herpesviren für die Replikation in Zellkultur entbehrlich sind. Nach Transfektion KHV-infizierter Zellen erlaubte die Expression des GFP-Reporterproteins die Identifizierung rekombinanter Virusnachkommen durch Fluoreszenzmikroskopie. Aus einzelnen grün fluoreszierenden Plaques wurden phänotypisch homogene Virusmutanten isoliert, deren Genomstruktur und biologische Eigenschaften zurzeit untersucht werden. Um die Herstellung rekombinanter Koi Herpesviren weiter zu vereinfachen, soll versucht werden, das vollständige KHV-Genom als artifizielles Bakterienchromosom zu klonieren (siehe Jahresbericht 2000, S. 53-55). In diesem Fall könnten die gewünschten KHV-Rekombinanten sehr viel schneller durch Mutagenese des Virusgenoms in E. coli und anschließende Transfektion von CCB-Zellen mit der infektiösen Plasmid-DNA hergestellt werden.

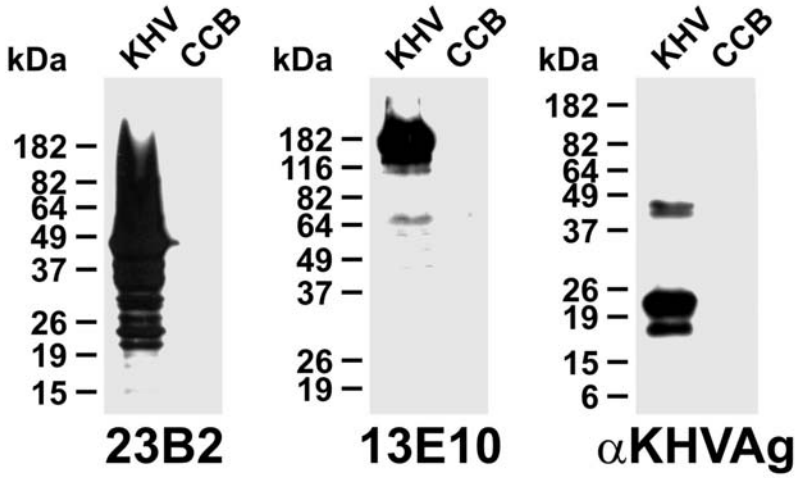


Abb. 3: Western Blot-Analysen KHV-infizierter (5 d p.i.) und nicht infizierter CCB-Zellen. Zelluläre und virale Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen getrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit zwei KHV-spezifischen monoklonalen Antikörpern (23B3, 13E10) bzw. einem monospezifischen Kaninchenserum (αKHVAg) inkubiert. Die Antikörperbindung an distinkte Virusproteine wurde durch Chemilumineszenz-Reaktionen Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper nachgewiesen. Die molekularen Massen wurden anhand von Markerproteinen (links) bestimmt.

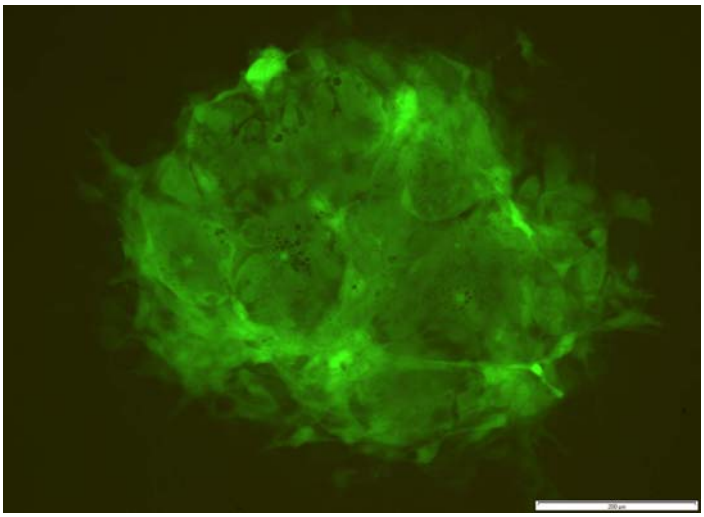


Abb. 4: Autofluoreszenz eines rekombinanten Koi Herpesvirus, das eine Expressionskassette für das GFP-Reporterprotein im Thymdinkinase Genlocus trägt. Die Virusplaques wurden vier Tage nach Infektion von CCB-Zellen aufgenommen. Balken: 200 μm.

5. Diagnose der KHV-Infektion

5.1. Virusisolierung und Identifizierung in Zellkulturen

Die erste Isolierung des KHV erfolgte mit der Zellline von der Flosse des Koi-Karpfens (Koi finn cell line, KF-1, Hedrick et al., 2000). Von Neukirch et al. (1999) wurde eine Zelllinie vom Gehirn des Karpfens, die Common carp brain cell line (CCB) empfohlen. Beide

Zelllinien befinden sich unter den Registriernummern 843 und 816 in der „Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin“ und stehen den Untersuchungsämtern zur Verfügung.
In eigenen Untersuchungen wurden die Zelllinien zur Vermehrung des KHV-Referenzstammes I (KHV-I, Isolat aus Israel, Hedrick et al., 2000) und der an das NRL eingesandten KHV-Isolate eingesetzt. Die KHV-Stämme und -isolate konnten bei Inkubationstemperaturen von 20 bis 26 °C angezüchtet werden. Nach partieller Reinigung des KHV-I erfolgte die Herstellung eines Hyperimmunserums (KHV-HIS). Das KHV-HIS ist zur Identifizierung des KHV in Zellkulturen mittels indirektem Immunfluoreszenztest geeignet (Abb. 5).

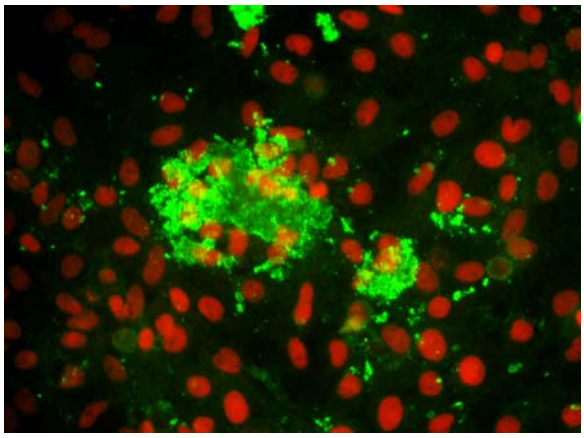


Abb. 5: Nachweis des KHV-I in CCB im IIFT mit KHV-HIS (1:2000)

Die Isolierung von KHV aus Organmaterial infizierter Karpfen gelang am NRL nur in Einzelfällen. Bei der Prüfung weiterer Zelllinien erwies sich eine Zelllinie des Silberkarpfens als empfänglich für KHV. Die Eignung zur Isolierung von Feldstämmen muss noch geprüft werden. In Übereinstimmung mit den Erfahrungen aus den regionalen Diagnostiklaboratorien und den Nationalen Referenzlabors der anderen EU-Mitgliedsländer ist die Virusisolierung mit den gegenwärtig vorhandenen Zelllinien wegen zu geringer Sensitivität demnach zum Nachweis von KHV in infizierten Karpfen nicht geeignet (Fichtner et al., 2003).

5.2. Monoklonale Antikörper gegen KHV

Unter Verwendung des KHV-Referenzstammes I (KHV-I, Isolat aus Israel, Hedrick et al., 2000) wurde eine Reihe von virusspezifischen monoklonalen Antikörpern (MAK) hergestellt. Hierzu wurde das Virus in CCB-Zellen vermehrt, konzentriert und Balb-C-Mäusen wiederholt appliziert. Nach der Fusion von stimulierten Lymphozyten aus der Milz mit SP2/0-Zellen wurden insgesamt 30 Antikörper-produzierende Hybridome isoliert, die spezifisch mit KHV reagierten. Das Screening erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) bei Verwendung von mit dem homologen Virus infizierten Zellkulturen.
Bei sechs von sieben getesteten MAKs handelt es sich um Immunglobulin IgG1, in einem Falle um IgG2a. Von 16 MAKs wurden die virusneutralisierenden Eigenschaften überprüft. In drei Fällen konnte eine signifikante, wenn auch nicht vollständige Neutralisation des homologen Virus festgestellt werden.
Neben der homologen Reaktion wurde im Rahmen der noch nicht abgeschlossenen Charakterisierung der MAKs überprüft, inwieweit die erhaltenen Antikörper auch mit den zur Verfügung stehenden deutschen KHV-Isolaten reagieren. Hierbei erwies sich als Hindernis, dass die Anzüchtung von KHV in der Zellkultur derzeit noch problematisch ist. Es zeigte sich, dass Voraussetzung für den Nachweis des Virus in der IIF infizierter Zellkulturen eine

ausreichende Virusvermehrung ist, mikroskopisch sichtbar anhand typischer zytopathischer Effekte. Die Untersuchungen ergaben, dass sämtliche MAKs zumindest mit einem, zehn der erhaltenen MAKs mit allen fünf überprüften KHV-Feldisolaten reagieren. In der Mehrzahl der Fälle wurde eine zytoplasmatische Fluoreszenz beobachtet, lediglich bei fünf MAKs dominierte eine Fluoreszenz im Kern (Abb. 6 und 7).
Bei drei von vier zufällig ausgewählten MAKs konnte in der Immun-Elektronenmikroskopie ebenfalls eine Reaktion mit dem Virus nachgewiesen werden. Im Westernblot wurden bei einigen der bisher untersuchten MAKs Reaktionen mit Proteinen von ca. 45, 70, 150 und 170 kDa Größe festgestellt (Abb. 3).

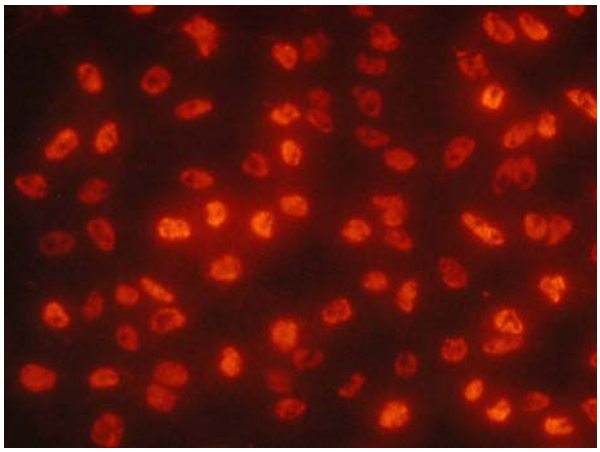


Abb. 6: MAK KHV/7H7 mit ausgeprägter Kernfluoreszenz (Cy3)

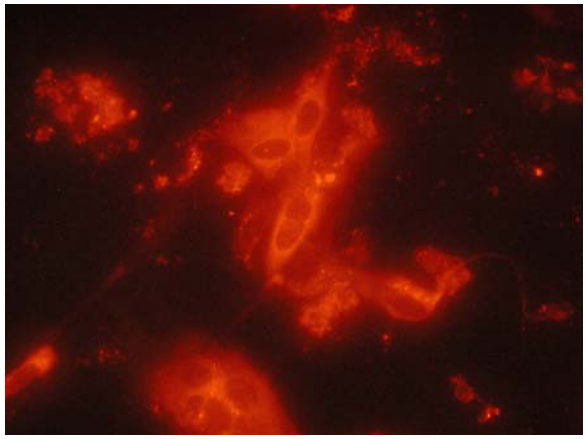
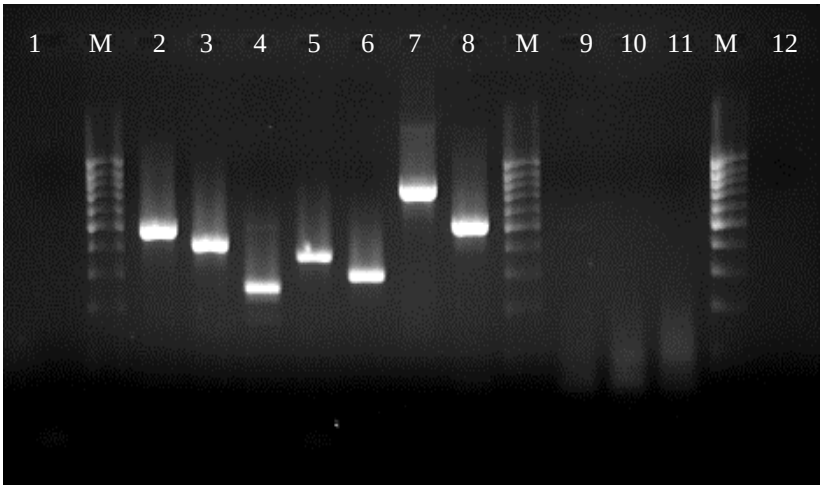


Abb. 7: MAK KHV/9F5 mit zytoplasmatischer Fluoreszenz (Cy3)

5.3. Diagnostik der KHV-Infektion beim Karpfen und beim Koi mittels molekularbiologischer Methoden

Gegenwärtig besteht die sicherste Methode beim Nachweis von KHV aus Organen infizierter Fische im Nachweis des Virusgenoms. Durch die äußerst schlechte Isolierbarkeit des Virus in der Zellkultur ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dabei die Methode der Wahl. Derzeit sind verschiedene PCRs, die zur Diagnostik herangezogen werden können, veröffentlicht. Neben den Standard-PCRs von Gilad et al. (2002) und Gray et al. (2002) und der „real time PCR“ (Gilad et al. 2004) wurden weitere Primer zum Nachweis des Virus durch die CNGV-Arbeitsgruppe von Moshe Kotler in Israel (u.a. Hutoran et al. 2004) veröffentlicht.

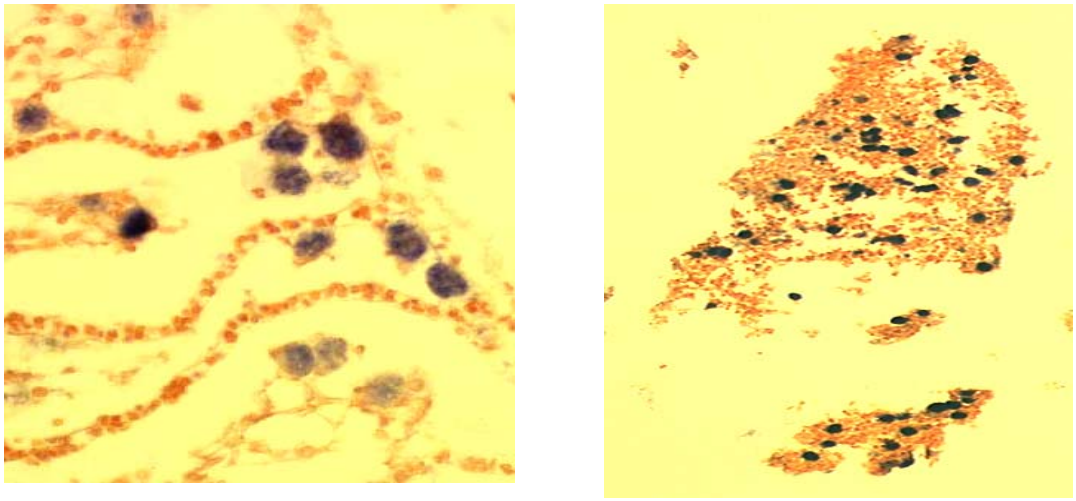
Im NRL-F wurden die beschriebenen Methoden in Zusammenarbeit mit den Kollegen in Davis (USA) und Jerusalem (Israel) etabliert und zum Nachweis von KHV bei Koi und Karpfen angewandt. Als problematisch erwies sich jedoch die Tatsache, dass häufig falsch negative Ergebnisse bei Fischen auftraten, die eine Infektion überlebt hatten und zum Zeitpunkt der Probennahme keine klinischen Symptome zeigten. Aus diesem Grund wurde an der weiteren Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten gearbeitet. Neben der Ableitung neuer Primer, basierend auf veröffentlichten Sequenzen verschiedener Genomabschnitte des Virus (DNA-Polymerase-Gen, Hüllglykoprotein-Gene) für PCR und nested PCR (Abb. 8) wurden verschiedene kommerziell verfügbare DNA-Polymerasen aus PCR-Kits im Rahmen der KHV-Diagnostik miteinander verglichen.



M 100 bp Marker (peqlab), 1 Gray-Primer 2 neg. Kontrolle; 2 Gilad-Primer (484 bp); 3 Bergmann-Primer 1 (392 bp); 4 Bergmann-Primer 2 (263 bp); 5 Gray-Primer 1 (365 bp); 6 Gray-Primer 2 (290 bp); 7 Bergmann-Primer 3 (766 bp); 8 Hutoran-Primer (517 bp); 9 Gilad-Primer neg. Kontrolle; 10 neg. Präparationskontrolle (Gilad-Primer); 11 neg. Präparationskontrolle (Gray-Primer 1); 12 Gray-Primer 1 neg. Kontrolle

Abb. 8: PCR mit verschiedenen Primern zum Nachweis von KHV (Referenzisolate KHV-I)

Ein Problem stellt die Bestätigung der PCR-Ergebnisse in einem weiteren Test dar. Die Sequenzierung der klonierten Amplikons verglichen mit veröffentlichten Sequenzen ist eine sichere, aber sehr aufwändige Methode. Mit der Etablierung weiterer PCRs und nested PCRs, die verschiedene Abschnitte des viralen Genoms amplifizieren konnten, wurde diese Aufgabe erleichtert (Bergmann et al. 2004). Weitere Möglichkeiten der Bestätigung von PCR-Reaktionen bestehen in der Verwendung der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern sowie der *In-situ*-Hybridisierung (Bergmann et al. 2004) mit verschiedenen DIG-markierten Sonden (Abb. 9).

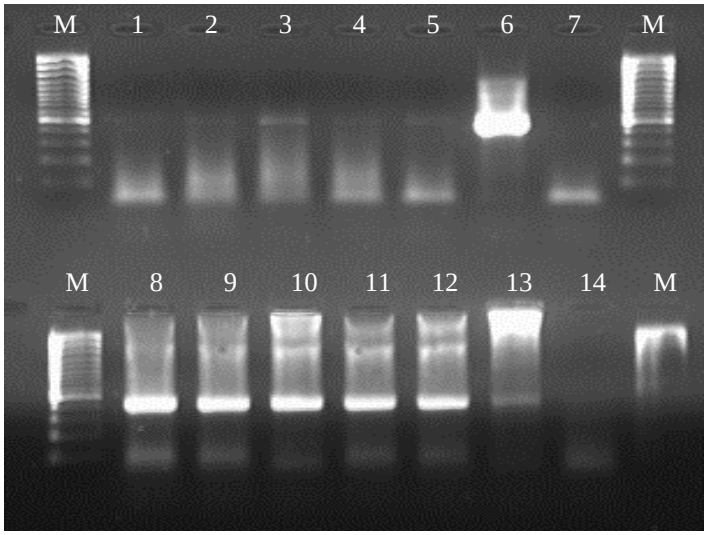


Sonde: Hutoran-Primer (40x)

Sonde: Bergmann-Primer 1 (20x)

Abb. 9: In-situ Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden zum Nachweis von KHV in Kiemen vom infizierten Koi (Bismarck-Brown-Yellow-Gegenfärbung)

Im NRL-F wurde die DNA von passagierten KHV-Isolaten (England, Deutschland, Polen, USA) und Organen KHV-infizierter Tiere (Israel, Indonesien, Thailand, Südafrika) erfolgreich in den PCRs nachgewiesen. Es gelang retrospektiv KHV-DNA in mit Paraffin eingebetteten, Formalin-fixierten Organen aus Südafrika in der PCR (Abb. 10) und in der *In-situ*-Hybridisierung nachzuweisen.



M 100 bp Marker (peqlab), 1 Probe 02267-1; 2 Probe 02267-2; 3 Probe 02267-3; 4 Probe 01.179-1 (Kiemen); 5 Probe 01.179 (Organe); 6 positive Kontrolle (KHV-I, CCB-Zellen); 7 negative Präparationskontrolle; 8 – 14 nested PCR der Proben 1 – 7

Abb. 10: Nachweis von KHV aus Paraffinschnitten in der PCR nach Gilad et al. (2002) und in der nested PCR (Bergmann Primer 1, Bergmann et al. 2004) mit Proben aus Südafrika

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die KHV-Infektion hat sich in den letzten Jahren weltweit verbreitet und stellt als neue Fischseuche eine Gefahr für die Produktion von Speisekarpfen dar. Neben der Etablierung

und Optimierung der Methoden zum Nachweis der KHV-Infektion erfolgten bisher elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphogenese, die Herstellung monoklonaler Antikörper und erste Arbeiten zur molekularbiologischen Charakterisierung des KHV.

Forschungsschwerpunkte zum KHV und zur KHV-Infektion sind zukünftig:

- Entwicklung und Verbesserung von Methoden zum Virus-, Antigen- und Genomnachweis sowie von Methoden zum Nachweis von Antikörpern im Blut;
- Molekularbiologische Untersuchungen zur Genomanalyse und zur Weiterentwicklung der Diagnosemethoden sowie die gentechnische Herstellung von Impfstoffen;
- Untersuchungen zur Pathogenese mit dem Ziel der Aufklärung des Infektionsweges, der Viruspersistenz/-latenz und Reaktivierung des Erregers, der Temperaturabhängigkeit des Krankheitsverlaufes sowie der Ermittlung der Antikörper-Dynamik wie auch der Empfänglichkeit verschiedener Fischspezies für KHV;
- Überprüfung der Möglichkeiten und Grenzen einer Immunprophylaxe.

7. Literatur

Bergmann, S.M. und Fichtner, D. (2003): Nachweis von piszinen Herpesviren mittels molekularvirologischer Methoden. DVG-Fachgruppe Fischkrankheiten, Workshop Koi-Herpes-Virus-Infektion, 2. Dez. 2003 in München.

Bergmann, S.M., Fichtner, D., Bulla, V. und Dresenkamp, B. (2004): Detection of Koi Herpesvirus (KHV) - Possibilities and limits. Oral presentation, 10th joint meeting of German, Austrian and Swiss EAFP braches, Stralsund, September 8th-10th, Germany.

Bocklisch, H., Landsiedel, U. und Dresenkamp, B. (2004) in Schlotfeldt, H.-J.: Severe losses of common carp in Germany due to Koi Herpesvirus (KHV). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 24, 216-217.

Bräuer, G. und Herms, J. (2004) in Schlotfeldt, H.-J.: Severe losses of common carp in Germany due to Koi Herpesvirus (KHV). Bull. Europ. Ass. Fish Pathol. 24, 216-217.

Bretzinger, A., Fischer-Scherl, T., Oumouna, M., Hoffmann, R. und Truyen, U. (1999): Mass mortalities in koi carp, Cyprinus carpio, associated with gill and skin disease. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 19(5), 182-199.

Fichtner, D., Bergmann, S.M., Granzow, H., Riebe, R. und Dauber, M. (2003): Nachweis des Koi-Herpesvirus mittels Immunelektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz unter Verwendung monoklonaler Antikörper. DVG-Fachgruppe Fischkrankheiten, Workshop Koi-Herpes-Virus-Infektion, 2. Dez. 2003 in München.

Gilad, O., Yun, S., Andree, K.B., Adkinson, M.A., Zlotkin, A., Bercovier, H., Eldar, A. und Hedrick, R.P. (2002): Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. Dis. Aquat. Org. 48, 101-108.

Gray, W., Mullis, L., LaPatra, S., Groff, J. und Goodwin, A. (2002): Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. Journal of Fish Diseases 25, 171-178.

Haenen, O.L.M., Way, K., Bergmann, S.M. und Ariel, E. (2004): The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 24(6), 293-307.

Hedrick, R.P. (2004) in: International Workshop on Koi Herpesvirus, London 12-13 Februar 2004. Report.

Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V, Marty, G.D., Nordhausen, R.W. and 3 others (2000): A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a common carp. J Aquat Anim Health 12, 44–57.

Hoffmann, R. (2000): Koiseuche bedroht Karpfenteichwirtschaft. Fischer und Teichwirt 11, 432.

Hutoran, M., Ronen, A., Perelberg, A., Dishon, A., Bejerano, I., Chen, N. und Kotler, M. (2005): Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased. *Cyprinus carpio* species. J. Virol. 79(4), 1983-91.

Neukirch, M., Böttcher, K. und Bunnajirakul, S. (1999): Isolation of a virus from koi with altered gills. Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol. 19, 221-224.

Neukirch und Kunz (2001): Isolation and preliminary characterization of several viruses from koi *(Cyprinus carpio)* suffering gill necrosis and mortality. Bull. Eur. Fish Pathol. 21, 125-135.

Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, Y. und Kotler, M. (2003): Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh. 55(1), 5-12.

Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M. und Kotler, M. (2003): Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio.* 21, 4677-4684.

4 INSTITUT FÜR NEUE UND NEUARTIGE TIERSEUCHENERREGER: AUFBAU EINES EFFIZIENTEN TSE-VERHÜTUNGS- UND BEKÄMPFUNGSSYSTEMS IN BULGARIEN – ERFAHRUNGSBERICHT ZU EINEM DEUTSCH-BULGARISCHEN TWINNINGPROJEKT

Groschup, M.H.* und Buschmann, A.
(in Zusammenarbeit mit Fiedler, J. [Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft])

Einleitung

Auf Bitten des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft zur aktiven Beteiligung in Twinning-Projekten zum Aufbau effizienter Foschungsstrukturen in den neuen Beitrittsländern der EU engagierten sich Mitarbeiter des FLI in vier Twinning-Projekten (Türkei, Slowenien, Bulgarien sowie Twinning light in der Slowakei), davon zweimal in leitender Funktion (Bulgarien, Slowakei). Seit Beginn des Jahres 2004 führte das Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger (Institutsleiter als Projektleiter) in Kooperation mit dem Langzeitberater vor Ort (Dr. J. Fiedler) ein solches Twinning-Projekt zum Aufbau eines effizienten TSE-Verhütungs- und Bekämpfungssystems in Bulgarien durch. Im Rahmen dieses Beitrages soll ein kurzer Bericht zur Aquisition, zum Umfang der projektbezogenen Tätigkeiten und zu den in Bulgarien bei deren Umsetzung gemachten Erfahrungen gegeben werden.

Das Twinning-Programm der EU

Mit dem Twinning-Programm ist die Europäische Union den mittel- und osteuropäischen Beitrittsländern beim Verwaltungsaufbau (Institution Building) behilflich, mit dem Ziel dort moderne, effiziente Verwaltungen einzurichten, die in der Lage sind, den acquis communautaire (Rechtsbestand) der Europäischen Union in demselben Umfang wie in den jetzigen Mitgliedsländern umzusetzen. Das Twinning-Programm wurde im Jahre 1998 erstmals aufgelegt. Die Unterstützung der Beitrittsländer soll dabei in einem Partnerschaftsprozess (’Twinning’) erfolgen, bei dem ein Langzeitberater (LZB) aus den Verwaltungen der Mitgliedsländer (auch: Heranführungsberater) die Beitrittsländer vor Ort während der gesamten Projektlaufzeit (12-24 Monate) unterstützt. Öffentliche Verwaltungen aus Mitglieds- und Kandidatenländern arbeiten dabei bei konkreten Projekten aus den Bereichen Umwelt, Landwirtschaft, Finanzen, Justiz/Inneres, Regionalentwicklung, Binnenmarkt, Telekommunikation, Energie, Arbeit, Gesundheit und Soziales zusammen. Die Volumina für die Beratungsleistungen reichen von 250.000 € bis zu 2.000.000 €. Einen Überblick über die deutschen Beteiligungen an den von der EU bewilligten Twinning-Projekten zwischen 1998 und 2003 und über die Projekte im Verbraucherschutz und Agrar-Bereich geben die Abbildungen 1-4.

In jedem Twinning-Projekt steuert ein Projektleiter und in seinem Auftrag der LZB das Projekt in dem jeweiligen EU-Mitgliedsstaat. Administrativ unterstützt wird der Projektleiter dabei durch einen Mandatar, z.B. die Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ), der zu diesem Zweck von der Projekt-leitenden Institution (d.h. im vorliegenden Fall dem FLI) vertraglich beauftragt wird. Neben den Langzeitberatern sehen diese Projekte den Einsatz von Kurzzeitexperten vor, die ihr Wissen u.a. in Form von Seminaren und Workshops vermitteln. Die Projekte enthalten Zielstellungen, deren Realisierung durch die Projektpartner zu garantieren ist.
Seit 1998 wurden den Mitgliedsstaaten insgesamt 925 Twinning-Projekte zugeteilt und aus dem PHARE-Budget der Europäischen Union finanziert. Davon wurden 205 Projekte von

deutschen Projektleitern (Bundes- oder Landeseinrichtungen) geleitet, womit Deutschland das aktivste Twinning-Land in der EU ist. Hierbei lagen die Schwerpunkte vor allem in den Bereichen Umwelt, Landwirtschaft, Wirtschaft und Inneres.

Nach dem Beitritt der ersten zehn neuen EU-Staaten im Mai 2004 wurde Twinning dort noch in einem begrenzten Umfang fortgeführt. Danach lagen die Schwerpunkte der Twinning-Projekte in Kooperationen mit Rumänien, Bulgarien und der Türkei.

Projekt-Aquisition

Wohl wenige Krankheiten haben in den letzten Jahren in der EU so viel Aufmerksamkeit erfahren und so viele, teilweise sehr tiefgreifende Aktivitäten ausgelöst wie die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE). Was zuerst als ‚Rinderwahn' ein veterinärmedizinisches Problem zu sein schien wurde ab 1996, als erstmalig eine neue Variante der humanen Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJK) beschrieben wurde, ein die Gesellschaft auch emotionell sehr bewegendes humanmedizinisches Problem. Es war daher konsequent, nicht nur in den bisherigen Mitgliedsländern der EU, sondern auch in den Beitrittsländern, unabhängig vom vorgesehenen Beitrittstermin, ein funktionierendes Überwachungs- und Bekämpfungssystem für alle Formen der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) bei Tieren aufzubauen und dies im Rahmen eines Twinning-Projektes zu unterstützen. Der erste Schritt für ein solches Twinning-Projekt war die Bewertung der Erfordernisse durch das Bewerberland Bulgarien.

Nach dieser Bedarfsfeststellung wurden die interessierten Mitgliedstaaten um konkrete Angebote für ein solches Twinning-Projekt mit Bulgarien gebeten. In Folge unterbreitete das FLI in Kooperation mit dem Langzeitberater und der Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (als administrativem Partner) ein schriftliches Projekt-Angebot (Projekt-Fiche). Dieses Angebot wurde zusammen mit drei weiteren konkurrierenden Angeboten am 03. Oktober 2002 dem Bulgarischen Ministerium für Landwirtschaft und Forsten und der EU-Kommission (CFCU) im Rahmen einer Angebots-Eröffnung in der EU-Vertretung in Sofia vorgestellt.

Bulgarien wählte nach weiteren Gesprächen mit allen Parteien schließlich das deutsche Angebot aus, da es seinen Erfordernissen am besten zu entsprechen schien. Die Twinning-Partner erstellten dann ein detailliertes Arbeitsprogramm in Form einer Vereinbarung und legten es der Kommission zur endgültigen Genehmigung vor. Das Projekt wurde schließlich mit einer Laufzeit vom 19.1.2004 bis 18.01.2005 genehmigt. Der finanzielle Rahmen lag bei 500.000 €. Diese Mittel flossen ausschließlich in die Projektarbeit vor Ort, sodass das FLI keinen monetären Nutzen aus dem Projekt zog.

Inhaltliche Ausrichtung des Twinning-Projektes mit Bulgarien

Das Projekt behandelte fünf **Kernarbeitsbereiche:**

A) Harmonisierung der bulgarischen Gesetze mit denen der EU
B) Fleischhygiene, Maßnahmen auf Schlachthöfen, Futtermittelkontrollen
C) Aufbau von Laborkapazitäten zur Durchführung eines TSE-Überwachungssystems in Bulgarien
    - auf der Ebene des nationalen Referenzlabors
    - auf der Ebene lokaler TSE-Schnelltestlabors

D) Erstellung eines EU-konformen TSE-Überwachungsplanes
E) Aufklärung der Öffentlichkeit

Diese fünf Kernarbeitsbereiche wurden in zweierlei Weise angegangen:

a) durch die Aktivität deutscher Kurzzeitexperten in Bulgarien
   - bei der Überprüfung der Umsetzung des Aquis communitaire
   - bei der Durchführung von Workshops zur Ausbildung diagnostisch geschulter Mitarbeiter
   - im Rahmen von Bereisungen zur Bestandsaufnahme in der Tierkörperbeseitigung, Fleischhygiene etc.
b) durch die Ausbildung bulgarischer Kollegen im Rahmen von Fort- und Weiterbildungsaufenthalten in Deutschland.

Umsetzung der Kernarbeitsbereiche

Ad A) Harmonisierung der bulgarischen Gesetze mit denen der EU

Der Nationale Veterinärdienst Bulgariens hatte bereits eine Vielzahl von TSE-relevanten Rechtsvorschriften der EU in das Landesrecht übertragen, dabei aber den Fragen der konkreten Umsetzung weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Dieser Sachstand fand auch im ‚Fortschrittsbericht der EU 2004' eine gleichermaßen positive wie kritische Wertung. Vor den deutschen Experten stand daher zuerst die Aufgabe, die bulgarischen Vorschriften auf die vollständige fachliche Übereinstimmung mit dem Gemeinschaftsrecht und die praktische Umsetzbarkeit hin zu bewerten. Im Ergebnis wurde eine umfangreiche Liste in bulgarischer Sprache an alle Fachbereiche der Veterinärverwaltung verteilt, in der sowohl auf bestehende fachliche Diskrepanzen als auch auf prinzipielle Unzulänglichkeiten hingewiesen wurde. Letzteres galt vor allem dem Vorschlag, in jeder Vorschrift dem System Maßnahmen – Verantwortlichkeit – Kontrolle – konkrete Strafbestimmungen bei Verstößen und Entschädigungen zu folgen. Die angesprochenen fachlichen Aspekte wurden sehr schnell bereinigt, die mehr prinzipiellen Anregungen sollen nun im Verlauf der anstehenden weiteren Rechtsanpassungen Berücksichtigung finden.

Ad B) Fleischhygiene, Maßnahmen auf Schlachthöfen, Futtermitteluntersuchungen

Die Separierung und unschädliche Beseitigung des TSE-Risikomaterials (u.a. Schädel mit Hirn und Augen, Rückenmark) auf den Schlachthöfen und bei Hausschlachtungen spielt im Gesamtsystem der Risikominimierung eine wesentliche Rolle. Deutsche Experten analysierten die Situation in drei Schlachthöfen und verfassten eine aus ihren Feststellungen resultierende „Aufgabenstellung", die an alle 28 regionalen Veterinärbehörden verteilt wurde. Sie war auch Grundlage für eine mehrtägige Fortbildung für die mit der amtlichen Fleischuntersuchung beauftragten Tierärzte aus den genannten Regionen, um ihnen vor Ort die Anforderungen der EU-konformen Fleischuntersuchung und der Behandlung des Risikomaterials zu demonstrieren. Gerade diese Praxisbezogenheit hat bei diesem wie auch bei den anderen Workshops größte Zustimmung bei den bulgarischen Kollegen gefunden.
Um für die verantwortlichen Tierärzte für Fleischhygiene, aber auch die Manager der Schlachthöfe künftig ein wirkungsvolles Trainings- und Demonstrationsobjekt für den „EU-Standard Schlachthygiene" zu haben, wurde den Behörden empfohlen, schnellstmöglich mindestens einen Schlachthof so zu rekonstruieren, dass er diese Aufgaben in dem geschilderten Sinn erfüllen kann.
Diese Aktivitäten wurden durch die labordiagnostische Etablierung von Futtermittel-untersuchungen auf Fleischmehl (Mikroskopie und ELISA) ergänzt.

Ad C) Aufbau von Laborkapazitäten zur Durchführung eines TSE-Überwachungssystems in Bulgarien

Die bulgarischen Behörden hatten im Rahmen ihrer bisherigen TSE-Konzeption bereits ein neues BSE-Labor im Zentralinstitut errichtet und mit allen diagnostischen Möglichkeiten zur Durchführung der Schnelltests versehen. Die dort beschäftigten zwei Tierärzte wie auch die Laboranten waren bereits gut ausgebildet und in der Lage, die Schnelltests in guter Qualität auszuführen. Seit dem Beginn der Untersuchungen wurden bis Ende 2004 insgesamt 19.830 Proben von großen und 3.846 Proben von kleinen Wiederkäuern untersucht. Alle diese Tests verliefen mit negativem Ergebnis. Da das Zentralinstitut auch die Aufgabe des nationalen Referenzlabors wahrnimmt, wurden die dortigen Mitarbeiter inzwischen am FLI in die Durchführung der von der OIE anerkannten Bestätigungsuntersuchungen eingeführt und sollen bis zum Projektende in der Lage sein, diese selbständig durchzuführen.

Darüber hinaus wurden die Laborkapazitäten zur Durchführung eines TSE-Überwachungssystems in Bulgarien auf der Ebene lokaler TSE-Schnelltestlabors ausgebaut und das Personal für zwei neue Labors außerhalb der Hauptstadt Sofia ausgebildet. Auch die vier für die Schnelltests in den zwei Laboratorien außerhalb Sofias ausgewählten Kollegen wurden in der gleichen Weise in Bulgarien und Deutschland auf ihre kommende Aufgabe vorbereitet.

Die von den Kurzzeit-Experten erstellten Expertisen waren immer praxisbewährt und praxisorientiert. Sie sahen dabei stets Auswahl der Methoden, Ausrüstung, Kosten und Vorbereitung des Personals als eine Einheit. Das heißt, sie orientierten sich immer auf das für die Erfüllung der Aufgaben wirklich Notwendige und waren daher für die Entscheidungsfindung der EU und der bulgarischen Behörden von besonderem Wert. Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang war die Orientierung auf die Akkreditierung der Untersuchungseinrichtungen.

Ad D) Erstellung eines EU-konformen TSE-Überwachungsplanes

Neben der Schaffung der nötigen Untersuchungskapazitäten wurden die Bereiche Epidemiologie, Bekämpfungsstrategien bei BSE und Scrapie sowie Datenmanagement im Zusammenhang mit TSE und Notfallplanung angesprochen und bulgarische Tierärzte wurden darin vor Ort sowie im Rahmen von Studienaufenthalten in Deutschland fortgebildet.

Es sei an dieser Stelle jedoch darauf hingewiesen, dass die Probenzahlen sowohl bei großen als auch bei kleinen Wiederkäuern noch weit unter den Normen der EU liegen. Gerade auf diesem Gebiet stehen die bulgarischen Behörden bis zum vorgesehenen Beitrittsjahr 2007 vor einer gewaltigen Aufgabe. Vor allem die völlige Zersplitterung der Viehbestände und häufig ausbleibende Informationen der Tierhalter an die Behörden über Verendungen, Not- oder Hausschlachtungen erschweren die ordnungsgemäße Probennahme. Die Autoren haben bei ihrem Auftreten in den entsprechenden Gremien immer wieder darauf hingewiesen, wie wichtig die Anzahl der von der EU vorgegebenen Untersuchungen ist, um eine verlässliche Aussage über die epidemiologische Situation hinsichtlich BSE und Scrapie zu ermöglichen, und dass nur so dem Verbraucherschutz wirklich Rechnung getragen werden kann.

Ad E) Aufklärung der Öffentlichkeit

Bereits die Eröffnungsveranstaltung für das Projekt am 24. Februar 2004 fand bei den Medien des Landes entsprechende Aufmerksamkeit. Obwohl Bulgarien bisher noch keinen Fall von BSE oder Scrapie hatte, war man doch gerade mit der Problematik BSE und der neuen Variante der CJK beim Menschen vertraut.

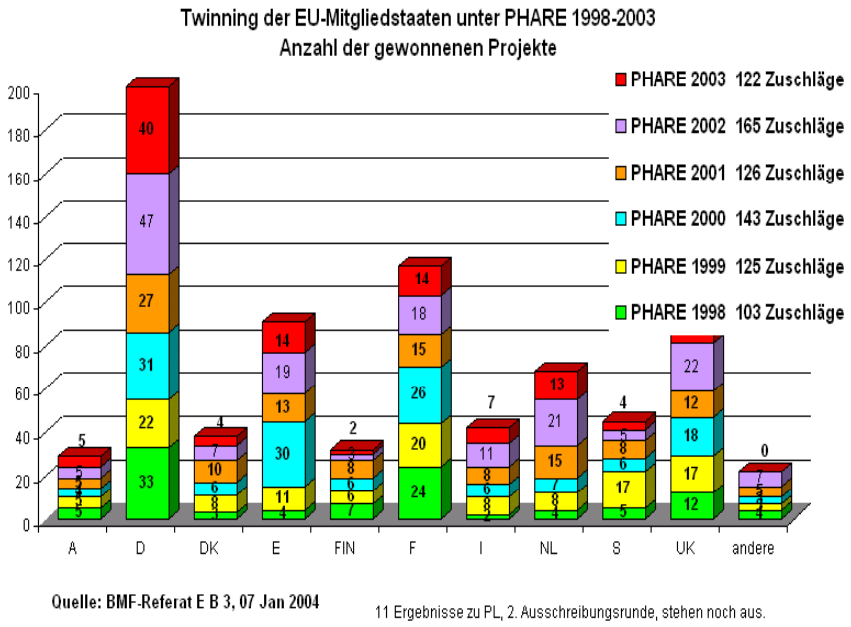
Bisherige Schwerpunkte der Öffentlichkeitsarbeit waren neben Fachzeitschriften vor allem die zwei Trainingskurse für Mitarbeiter der Wirtschaft und des Veterinärdienstes über Methoden und Instrumente auf diesem Gebiet.

In Vorbereitung ist eine Broschüre, die für die Angehörigen des Veterinärdienstes und die interessierte Öffentlichkeit alle Aspekte der TSE-Vorbeugung und der notwendigen Maßnahmen bei einer Feststellung in Bulgarien beinhaltet.

Danksagung
Im Rahmen der Durchführung dieses Twinning-Projektes waren eine Reihe von tierärztlichen Kollegen und Institutionen beteiligt, ohne deren Engagement, Expertise und Zusammenarbeit mit dem Projektleiter und dem Langzeit-Experten dieses Projekt nicht erfolgreich gewesen wäre. Im Einzelnen sind zu nennen:

- BMVEL (Dr. Wiemer, Frau Neuwerth)
- Länderreferenten Dr. Reimer (BB) und Dr. Wehner (SA),
- Amtstierärzte Dr. Kröll und Dr. Domel (Thüringen), Frau Dr. Anke (TH) und Dr. Schoenherr (BB)
- LUA Leipzig (Dr. Hardt)
- Dr. Letz (BB) und Dr. Seidler (NS).
- Institut für Epidemiologie, Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen (Dr. Kramer, Dr. Pötzsch, Dr. Staubach, Herr Micklich und PD Dr. Conraths)
- Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems (Dr. Buschmann, Dr. Ziegler, Dr. Eiden, Dr. Weber und Fr. Schultz)

Abb. 1)



Quelle: BMF-Referat E B 3, 07 Jan 2004

11 Ergebnisse zu PL, 2. Ausschreibungsrunde, stehen noch aus.

Abb. 2)

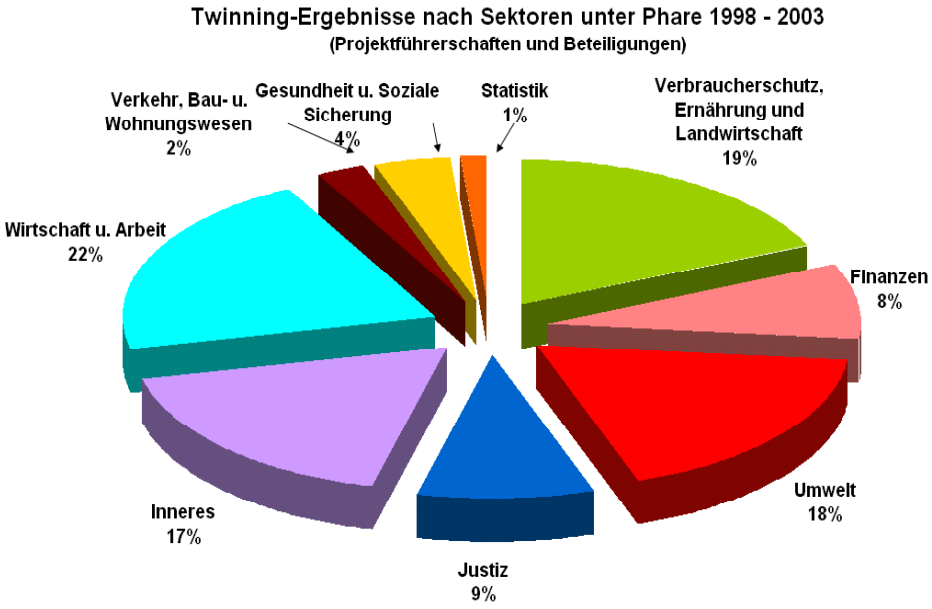


Abb. 3)

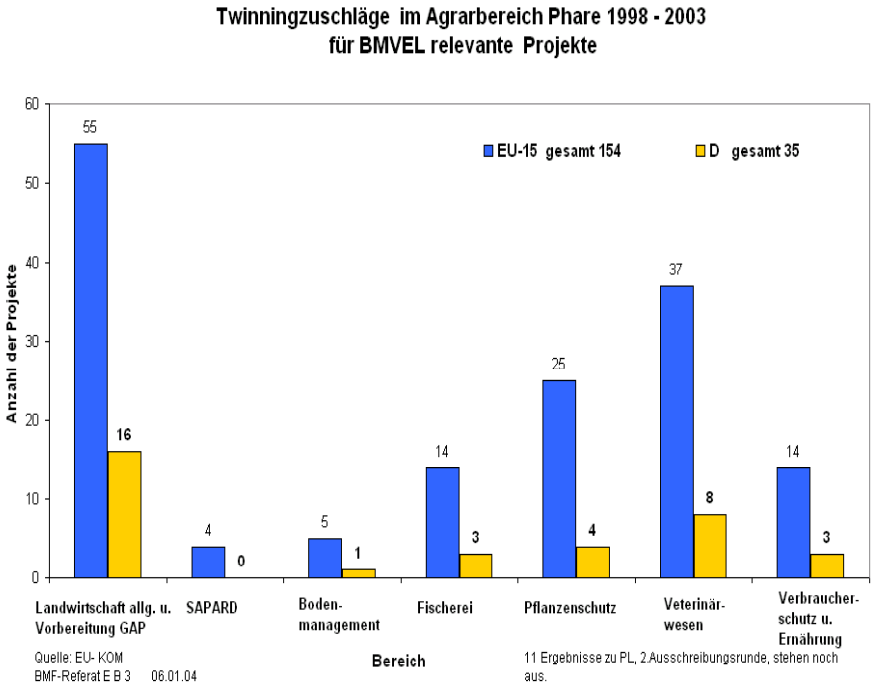
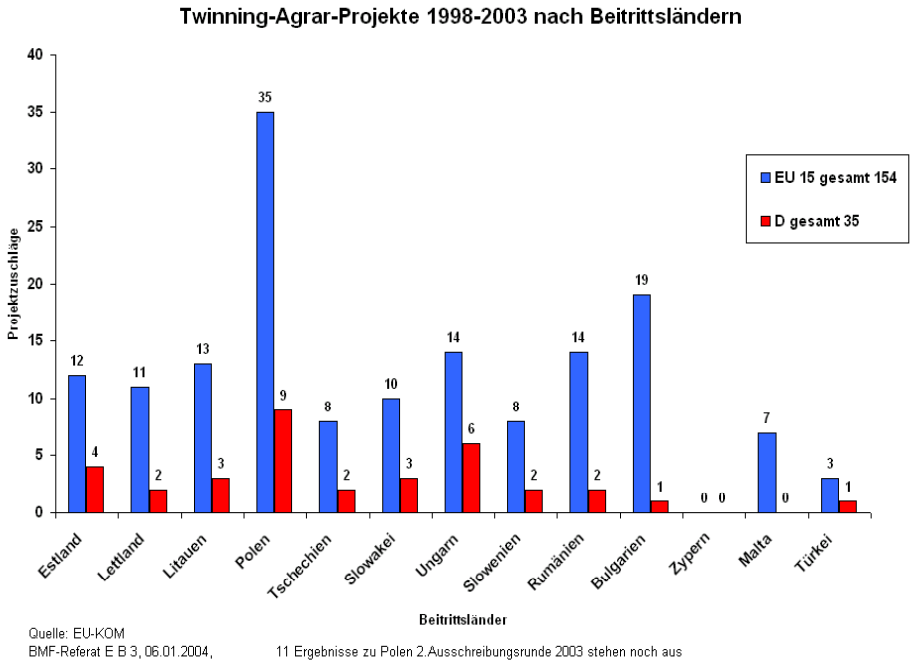

Twinningzuschläge im Agrarbereich Phare 1998 - 2003
für BMVEL relevante Projekte
EU-15 gesamt 154
D gesamt 35
Anzahl der Projekte
55
16
4
0
5
1
14
3
25
4
37
8
14
3
Landwirtschaft allg. u. Vorbereitung GAP
SAPARD
Boden-management
Fischerei
Pflanzenschutz
Veterinär-wesen
Verbraucher-schutz u. Ernährung
Bereich
Quelle: EU- KOM
BMF-Referat E B 3 06.01.04
11 Ergebnisse zu PL, 2.Ausschreibungsrunde, stehen noch aus.

Abb. 4)


Twinning-Agrar-Projekte 1998-2003 nach Beitrittsländern
EU 15 gesamt 154
D gesamt 35
Projektzuschläge
12
4
11
2
13
3
35
9
8
2
10
3
14
6
8
2
14
2
19
1
0 0
7
0
3
1
Estland
Lettland
Litauen
Polen
Tschechien
Slowakei
Ungarn
Slowenien
Rumänien
Bulgarien
Zypern
Malta
Türkei
Beitrittsländer
Quelle: EU-KOM
BMF-Referat E B 3, 06.01.2004,
11 Ergebnisse zu Polen 2.Ausschreibungsrunde 2003 stehen noch aus

5 INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE: NUCLEAR FACTOR kappaB UND NEUROPROTEKTION NACH INFEKTION

Bourteele, S., Rziha, H.-J., Oesterle, K., Stitz, L. und Planz, O.*

Einleitung

Der Transkriptionsfaktor „Nuklear Faktor kappaB“ (NF-κB) steht seit einigen Jahren im Mittelpunkt der Forschung über neuronale Apoptose und Neuroprotektion. Die Bezeichnung Apoptose wird seit mehr als 30 Jahren verwendet und beschreibt eine bestimmte Form des Zelltodes, der sich von der Zellnekrose unterscheidet. Embryonal und postembryonal wird die Apoptose für die Entwicklung der biologisch optimalen Anzahl von Zellen, korrekter Morphologien oder Organfunktionen benötigt. Beispielsweise werden postembryonal im Zentralnervensystem, abhängig vom neuronalen Zelltyp, bis zu 80 % der Zellen durch Apoptose eliminiert. Dieser Prozess ist notwendig, um die Funktion des postembryonalen Gehirns zu gewährleisten. Apoptose ist auch im Gehirn bei verschiedenen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer, Huntington´s Disease und CJD beim Menschen und BSE und Scrapie beim Tier zu finden. Apoptose kann sowohl extrazellulär durch Bindung Apoptose-induzierter Liganden an so genannte „Death“ Rezeptoren der Zelloberfläche als auch intrazellular durch Veränderung der zellulären Homöostase induziert werden.

NF-κB ist ein bedeutender Regulator der Zellabwehr gegen Pathogene. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von Entzündungsprozessen und begünstigt die Zellproliferation sowie das Überleben der Zelle. Erste Aufmerksamkeit als Regulator von Apoptose und Neuroprotektion im Zentralnervensystem erlangte NF-κB durch Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass Aktivierung von NF-κB über Vermittlung des Tumornekrosefaktors alpha (TNFα) neuronale Apoptose in Zellkultur verhindern konnte. Neben verschiedenen Zytokinen und neurotropen Faktoren kann NF-κB auch durch oxidativen Stress im Gehirn aktiviert werden. NF-κB bezeichnet eine Klasse von dimeren Transkriptionsfaktoren, die zur Rel Familie gehören. In Säugerzellen gibt es 5 Rel Proteine, die in zwei Gruppen zusammengefasst sind. Eine Gruppe, zu denen RelA (p65), RelB und c-Rel gehören, besitzt Transaktivierungsdomänen, während die Rel Proteine der zweiten Gruppe, zu denen p50 (NF-κB1) und p52 (NF-κB2) gehören, keine transkriptionelle Aktivität besitzen. NF-κB ist überwiegend als p65/p50 Heterodimer in der Zelle nachweisbar, aber es sind auch andere Kombinationen der verschiedenen Rel Proteine und Homodimerbildungen möglich. In den meisten Zellen existiert NF-κB als ein inaktiver, cytoplasmatischer Komplex. In einigen Zellen des Zentralnervensystems jedoch ist NF-κB konstitutiv aktiv und somit im Zellkern nachweisbar.

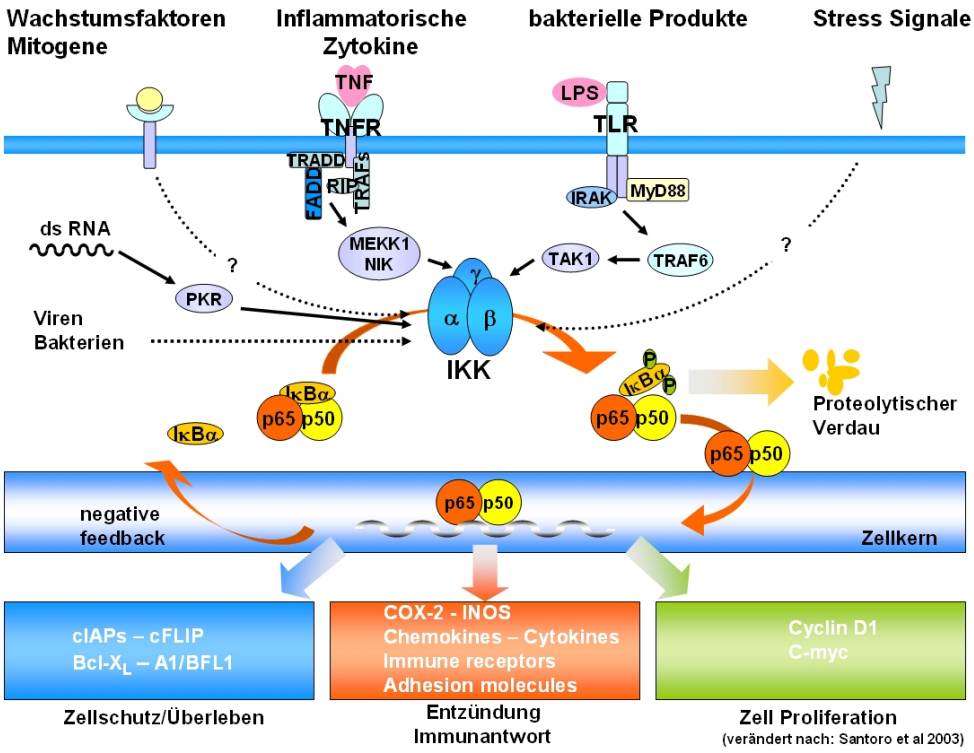


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von NF-κB.

NF-κB wird im Zytoplasma durch das inhibitorische Protein IκBα (Inhibitor von κB) in einem inaktiven Zustand gehalten. Extrazelluläre Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Mitogene, inflammatorische Zytokine, bakterielle Produkte oder Stresssignale sowie intrazelluläre Stimulation durch bakterielle und virale Pathogene führen zur Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden, die an dem IKK Komplex (Inhibitor von κB Kinase) zusammenlaufen. Phosphorylierung von IκBα durch aktiviertes IKK führt zu einem proteolytischen Verdau von IκBα. Die durch diesen Prozess frei gegebenen NF-κB Dimere wandern in den Zellkern und binden an κB Elemente. Dies führt zur Aktivierung von Genen, die bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind (Abb.1).

NF-κB liegt im normalen Gehirn in Neuronen in einem konstitutiv aktiven Zustand vor und dient somit der Neuroprotektion und der Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität. Ferner kann NF-κB durch verschiedenste Stimuli im Gehirn aktiviert werden. Eine interessante Rolle spielt hierbei TNF, das von verschiedenen Zelltypen im Gehirn u.a. nach Infektionen synthetisiert werden kann. Abhängig vom Zelltyp führt eine TNF-vermittelte NF-κB Aktivierung entweder zur Apoptose, zu anti-apoptotischen Prozessen oder zur Produktion von weiteren Zytokinen (Abb. 2). Somit kann NF-κB ganz gezielt die Folgen einer Infektion im Zentralnervensystem beeinflussen. Aufgrund der heterogenen und vielfältigen Reaktionen nach NF-κB Aktivierung oder auch Hemmung von NF-κB sind diese Folgen einer Infektion erregerabhängig und können nicht auf andere Erreger übertragen werden. Die Untersuchung der Beteiligung von NF-κB bei Infektionskrankheiten im Zentralnervensystem stellt somit eine Grundlage zum Verständnis der jeweiligen Erkrankung dar.

Stimulus	Zelltyp	Effekt	Modulierte Gene
TNF	Vask. Endothel Neuronen Astrozyten Mikrogliazellen	Apoptose, Zytokinproduktion Verhinderung der Apoptose Verhinderung der Apoptose Zytokinproduktion	Zytokine, Adhesion MnSOD, Calbinin MnSOD, Calbinin TNF, IL-6, TGFβ
Glutamat	Neuronen	Synaptische Plastizität, Verhinderung der Apoptose	Glutamatrezeptoren ?, MnSOD, Calbinin
NGF	Neuronen	Verhinderung der Apoptose	?
O-Radikale	Verschied. Zellen	Verhinderung der Apoptose	MnSOD, Calbinin
Amyloid ß peptide	Neuronen, Mikroglia-zellen	Stress Antwort, Schutz, Aktivierung von Microgliazellen	?
sAPPα	Neuronen	Neuroprotektion	?

Abb. 2: Beispiele von verschiedenen Faktoren, die in der Lage sind, im Zentralnervensystem NF-κB zu aktivieren.

Nachfolgend werden Untersuchungen zusammengefasst, die die Beteiligung von NF-κB bei der Meningoenzephalitis nach Borna Disease Virus Infektion in der Ratte sowie bei der spongiformen Enzephalopathie nach Scrapie Infektion in Mäusen beschreiben.

NF-κB im Gehirn nach BDV Infektion

Die experimentelle Borna Disease Virus (BDV) Infektion von Ratten stellt ein ausgezeichnetes Modell zur Untersuchung einer virus-induzierten, immunvermittelten Entzündungsreaktion sowie Degeneration im Zentralnervensystem dar. Hierbei kommt es nach intrazerebraler oder intranasaler Infektion zunächst zur Virusvermehrung im Hippocampus und im weiteren Verlauf der Infektion im gesamten Gehirn. Die Entzündungsreaktion ist durch Aktivierung einer Vielzahl von Zyto- und Chemokinen sowie perivaskulärer und parenchymaler Infiltrate gekennzeichnet. CD8+ und CD4+ T-Zellen sowie Makrophagen sind hauptsächlich in den Infiltraten zu finden. CD8+ T-Zellen haben eine direkte Effektorfunktion, während CD4+ T-Zellen Helferfunktionen besitzen.

Um die Rolle von NF-κB bei der Meningoenzephalitis und neuronaler Degeneration nach BDV Infektion im Rattengehirn zu verstehen, ist es notwendig, den Effekt des BDV auf die NF-κB Aktivität zu untersuchen. *In vitro* Experimente zeigten, dass nach akuter BDV Infektion keine NF-κB Bindungsaktivität gemessen werden konnte (Abb. 3A). Neben dieser fehlenden Bindungsaktivität konnte nach BDV Infektion unter Verwendung von Meerschweinchengehirn (CRL)-Zellen auch keine transkriptionelle Aktivität gefunden werden. Im Gegenteil, die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eher eine Reduktion der NF-κB Aktivität nach BDV Infektion zu beobachten ist (Abb. 3B). In weiteren Infektionsexperimenten mit CRL-Mutantenzellen, die entweder dominant negativ oder konstitutiv aktiv für IKK sind oder eine funktionelle IκBα Deletion aufweisen, konnte beobachtet werden, dass der BDV Titer in den konstitutiv aktiven IKK CRL-Zellen (CRL-IKK EE Zellen) drastisch reduziert war (Abb. 3C). IKK stellt eine zentrale Einheit für die Regulation der NF-κB Aktivierung dar (siehe Abb. 1). NF-κB wiederum spielt eine zentrale

Rolle bei der Aktivierung von Genen, die für Proteine kodieren, die bei der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Unter anderem wird die Expression von Typ I Interferonen durch NF-κB reguliert. Typ I Interferone sind entscheidend an der angeborenen Immunabwehr gegen Viren beteiligt. Interessanterweise führt eine BDV-Infektion in verschiedenen Zelllinien nicht zur Sezernierung von Typ I Interferonen. Die Tatsache, dass nach BDV-Infektion eine NF-κB Aktivierung ausbleibt, gibt nun Anlass zur Spekulation, dass BDV direkt die Aktivierung von NF-κB unterdrückt. In der Tat konnte in Zusammenarbeit (T. Wolff, Berlin) gezeigt werden, dass ein BDV-spezifisches Protein in der Lage ist, die Aktivierung von IKK zu blockieren. Hingegen führt eine konstitutiv aktive Form von IKK nach BDV-Infektion zur Aktivierung von NF-κB und dem Interferon regulierenden Faktor 3 (IRF-3), was somit zur Sezernierung von Typ I Interferon führt.

Dies wiederum führt zur Reduktion der Virusmenge in BDV infizierten CRL-IKK EE Zellen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die gleichen IKK/IκB Mutanten mit Vero Zellen, die nicht in der Lage sind, Typ I Interferone zu sezernieren, etabliert. Hier führt eine Infektion der Vero IKK EE Zellen nicht zur Reduktion der Virusmenge (Abb. 3D), was die Hypothese bekräftigt, dass NF-κB über die Regulation von Typ I Interferon den BDV Titer in der Zellkultur kontrollieren kann. In einer normalen, nicht manipulierten Zelle verhindert die BDV Infektion die Aktivierung von NF-κB und somit von Typ I Interferon. Wird zu solchen BDV-infizierten Zellen extern Typ I Interferon hinzugeben, führt dies konzentrationsabhängig zur Reduktion des Virustiters (Abb. 3E).

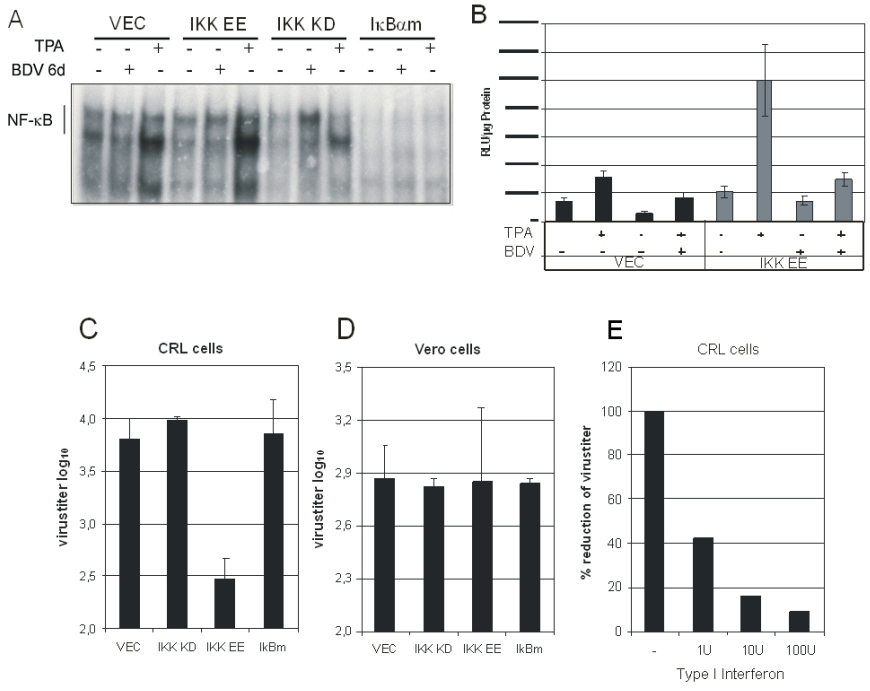


Abb. 3: Ein NF-κB spezifischer Bindungstest (**E**lektro-**M**obilität-**S**hift-**A**ssay, EMSA) zeigt keine NF-κB Bindungsaktivität nach BDV Infektion **(A)**. Weiterhin ist im NF-κB spezifischen Aktivitätstest (3 x κB Luciferase Reportergen Assay) keine spezifische Aktivierung nachweisbar (B). BDV Infektion von CRL IKK/IκB Mutantenzellen **(C)** und Vero IKK/IκB Mutantenzellen **(D)**. Externe Zugabe von Typ I Interferon führt konzentrationsabhängig zur Reduktion des BDV Titers **(E)**.

BDV ist in der Lage, die Aktivierung von NF-κB zu unterdrücken, was eine Persistenzstrategie des Virus darstellen könnte. Durch die Tatsache, dass NF-κB im Gehirn, dem primären Zielorgan des BDV, konstitutiv aktiv vorliegt, stellt sich die Frage, ob die *in vitro* Untersuchungen auch auf die *in vivo* Situation extrapoliert werden können.

Im Hippocampus des Rattengehirns ist NF-κB lediglich diffus bzw. perinukleär nachweisbar (Abb. 4A). Hingegen konnte in immunhistologischen Untersuchungen mit einem Antikörper, der phosphoryliertes und somit aktiviertes p65 erkennt, im gesamten Cortex und im Cerebellum aktiviertes NF-κB gefunden werden (Abb. 4B). Dieses Bild der NF-κB Verteilung im Gehirn ändert sich jedoch nach BDV Infektion. Während in den frühen Phasen der Infektion noch keine Veränderungen zu sehen sind, ist NF-κB in der akuten Phase der Entzündung (Tag 17-21 p.i.) verstärkt nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt ist auch aktiviertes NF-κB im Hippocampus zu finden (Abb. 4C). In der akuten Phase der BDV-Infektion werden eine Vielzahl von Zytokinen, die in der Lage sind, NF-κB zu aktivieren, im Gehirn exprimiert. Die Zunahme der NF-κB Aktivität im Gehirn nach BDV Infektion wird somit eher durch einen sekundären Effekt, als durch einen direkten viralen Effekt hervorgerufen.

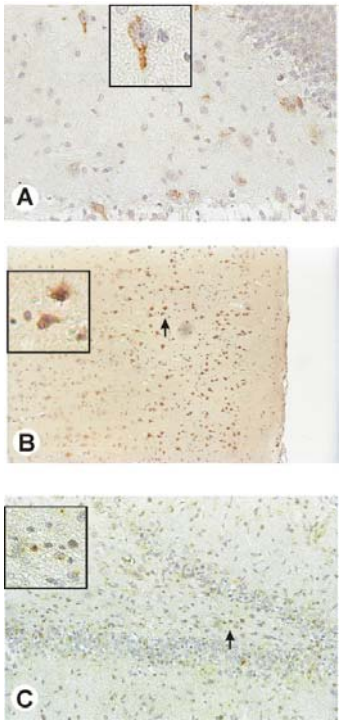


Abb. 4: Immunhistologische Untersuchung der NF-κB Aktivität im normalen Rattengehirn (A, B) und nach BDV Infektion (C). Im Hippocampus ist eine diffuse bzw. perinukleäre phospho-p65 Färbung festzustellen, die nicht auf aktiviertes NF-κB hindeutet **(A)**. Im Gegensatz dazu ist in vielen Teilen des Cortex eine phospho-p65 spezifische Färbung im Zellkern zu finden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in diesen Zellen NF-κB konstitutiv aktiv ist **(B)**. Nach BDV Infektion ist eine phospho-p65 spezifische Färbung auch im Hippocampus zu finden **(C)**.

Nach Infektion ist BDV zuerst im Hippocampus nachweisbar. Von dort breitet sich das Virus im weiteren Verlauf der Infektion in den Cortex und das Cerebellum aus. Interessanterweise werden in diesen beiden Hirnregionen nur solche Areale von dem Virus infiziert, in denen kein aktiviertes NF-κB nachweisbar ist. So konnten in immunhistologischen Untersuchungen im frontalen Cortex Gebiete mit aktiviertem NF-κB (Abb. 5A, B) gefunden werden, die frei von BDV waren. In den angrenzenden Arealen konnte hingegen BDV nachgewiesen werden (Abb. 5C, D). Das gleiche Verteilungsmuster war auch im Cerebellum zu beobachten. NF-κB aktive Purkinje Zellen sind nicht mit BDV infiziert (Abb. 5E), sondern nur die benachbarten Zellen (Abb. 5F). Im Gegensatz dazu ist in der frühen Phase der BDV Infektion (Tag 12 p.i.) kaum phospho-p65 im Hippocampus (Abb. 5G), dem Ort, in dem zuerst BDV nachweisbar ist (Abb. 5H), zu finden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass das BDV Strategien entwickelt hat, eine Aktivierung von NF-κB zu verhindern, bzw. in der frühen Phase der Infektion im Gehirn Gebiete mit starker NF-κB Aktivität meidet, um nicht zellulären Abwehrmechanismen ausgesetzt zu sein. Diese Ergebnisse am Modell der experimentellen BDV Infektion der Ratte bieten eine Grundlage für Untersuchungen zur Rolle von NF-κB bei der Neurodegeneration, wie sie bei verschiedenen Erreger- und nicht Erreger-bedingten Erkrankungen des Zentralnervensystems auftritt.

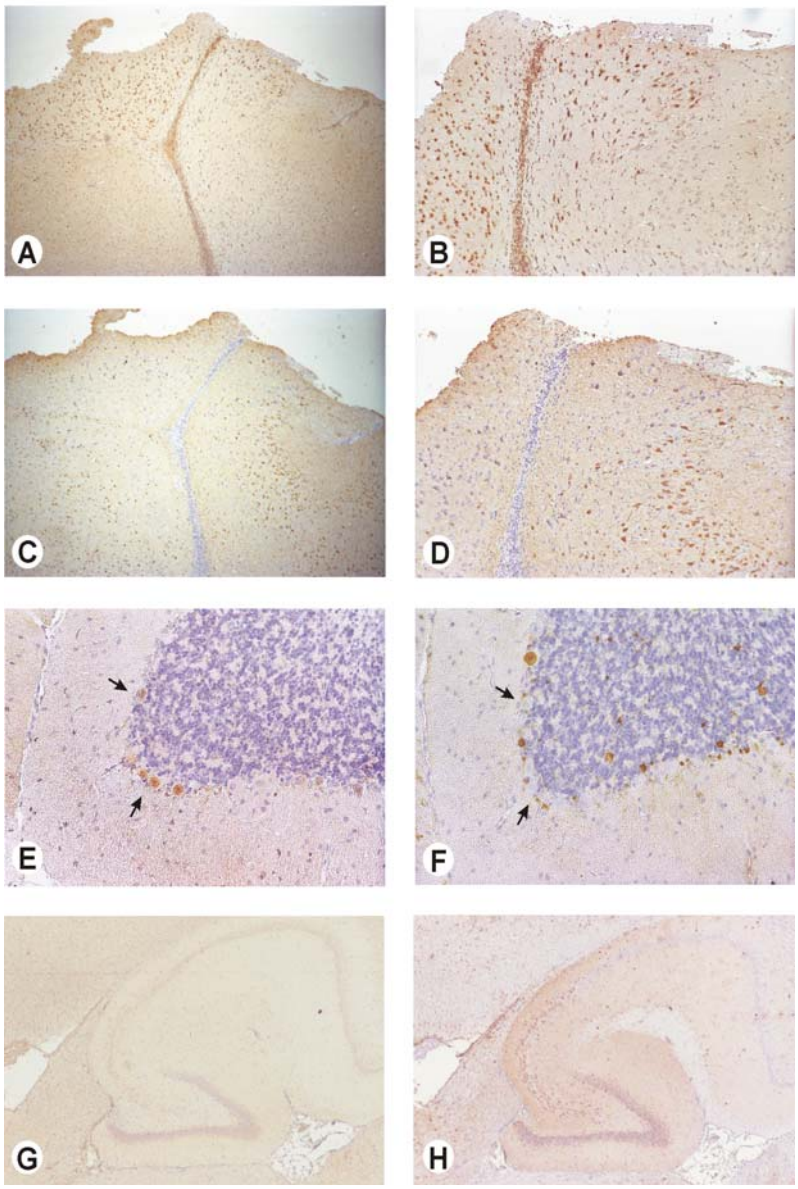


Abb. 5: Immunhistologischer Nachweis von aktiviertem NF-κB mit Hilfe eines anti-phospho p65 spezifischen Antikörpers **(A, B)**. Immunhistologischer Nachweis von BDV in der gleichen Gehirnregion **(C, D)**. Es ist deutlich zu erkennen, dass BDV in Arealen nachweisbar ist, in denen kein aktiviertes NF-κB zu finden ist. Dies trifft auch im Cerebellum zu, wo phospho-p65 spezifische Purkinjezellen **(E)** nicht BDV positiv sind **(F)**. Im Gegensatz dazu ist zu einem frühen Zeitpunkt nach BDV-Infektion (Tag 12 p.i.) im Hippocampus kaum aktiviertes NF-κB nachweisbar **(G)**, jedoch eine starke Vermehrung von BDV **(H)**.

NF-κB im Gehirn nach Scrapie Infektion

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE), stellen eine weitere Erkrankung mit neurodegenerativen Veränderungen des Zentralnervensystems dar. Es herrscht Übereinstimmung, dass diese Erkrankungen wie die Creutzfeld-Jacob Erkrankung (CJD) beim Menschen, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und Scrapie beim Schaf auf einer konformationellen Veränderung im zellulären Prionprotein (PrP^{C}) beruhen, wodurch es zur Anreicherung einer pathologischen Isoform des Prionproteins (PrP^{SC}) im Gehirn kommt. PrP^{SC} kann nicht metabolisiert werden, weshalb es zu einer massiven Ablagerung und zur Induktion eines Mechanismus kommt, der den Zelltod auslöst und zum charakteristischen Bild der spongiformen Enzephalopathie führt.

Das zelluläre Prionprotein (PrP^{C}) ist ein glykosyliertes Protein, das mit einem Glykosyl-Phosphatidylinositolrest in der Zellmembran verankert ist. Daher kann dem Prionprotein grundsätzlich eine Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung zukommen. Allerdings ist über den Mechanismus dieser Signalübertragung nur wenig bekannt. Einige Studien zeigten, dass antikörpervermittelte Quervernetzung des zellulären membranständigen Prionproteins zur Aktivierung der Tyrosinkinase Fyn führt, was das zelluläre Prionprotein als einen Kandidaten für ein funktionelles Signal-Transduktionsprotein erscheinen lässt. Weiterhin ist bekannt, dass es nach PrP Infektion zur Aktivierung der klassischen mitogenen Raf/MEK/ERK Signalkaskade kommt. Diese Signal-Transduktionskaskade ist an Entzündungsreaktionen beteiligt. Die genauen Mechanismen dieser Aktivierung sind jedoch im Detail noch nicht untersucht.

Die Eigenschaft von NF-κB, als Regulator von pro- und anti-apoptotischen Prozessen im Zentralnervensystem zu fungieren (Abb. 2), stellt NF-κB in den Mittelpunkt von Untersuchungen zur Interaktion des pathologischen Prionproteins mit intrazellulären Signalwegen. Als Grundlage für Untersuchungen, die dem Verständnis der Rolle von NF-κB bei der Neuroprotektion bzw. bei proapoptotischen Prozessen im Gehirn dienen, wurden auch in diesem Projekt *in vitro* Untersuchungen vorangestellt. Eine Infektion von Neuroblastomazellen (N2A) mit dem Scrapie Stamm RML6 führt zu einer produktiven Infektion und zur Bildung pathologischen Prionproteins. Im Gegensatz zu der oben erwähnten BDV Infektion von CRL-Zellen führte eine Infektion von N2A Zellen mit RML6 bereits einen bzw. vier Tage nach Infektion zu einer NF-κB Bindeaktivität (Abb. 6A). Jedoch konnte in dem Reportergen Assay keine NF-κB Aktivität festgestellt werden (Abb. 6B). Diese vermeintliche Diskrepanz der Ergebnisse zweier unterschiedlicher Tests wurde mit Hilfe eines Supershifts aufgeklärt. In diesem Test mit Kernextrakten von RML6 infizierten N2A Zellen konnte nur ein Shift des Protein/Nukleinsäurekomplexes nach Zugabe des p50 spezifischen Antikörpers beobachtet werden (Abb. 6 C). Diese Ergebnisse zeigen, dass im Kern RML6 infizierter N2A Zellen NF-κB als p50/p50 Homodimer vorliegt. Da p50 keine transaktivatorische Domäne besitzt, führt die gezeigte NF-κB Bindung nicht zur Aktivierung NF-κB spezifischer Zielgene, was die vermeintliche Diskrepanz zwischen den verschiedenen Tests erklärt.

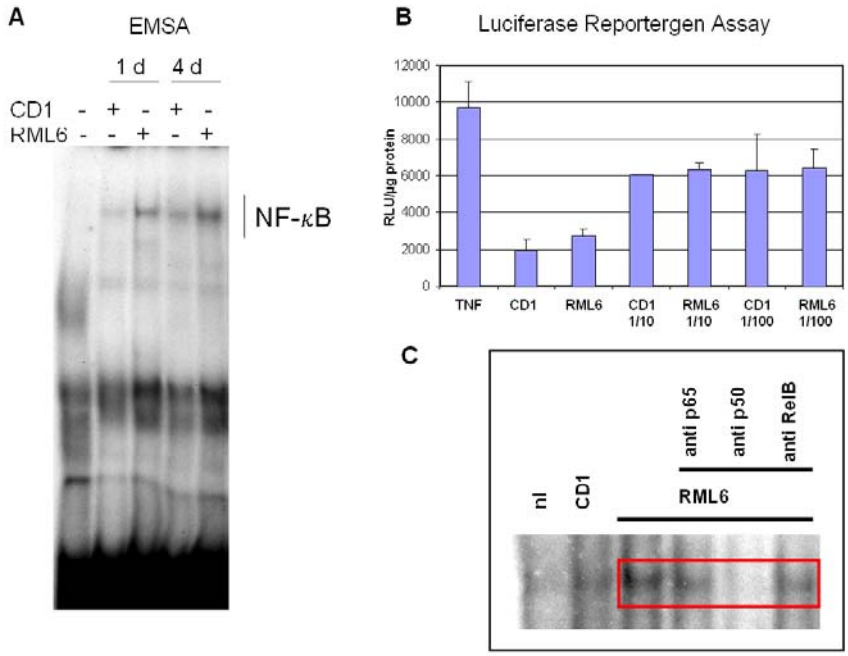


Abb. 6: Der Elektromobilitäts Shift Assay zeigt in N2A Zellen nach RML6 Infektion am Tag 1 p.i. und 4 p.i. im Vergleich zur Kontrolle (CD1, mock) eine NF-κB Bindeaktivität **(A)**. Keine κB spezifische Luciferase Reportergenaktivität in RML6 infizierten N2A Zellen im Vergleich zur Kontrolle (CD1, mock) **(B)**. Nur bei Zugabe des anti-p50 spezifischen Antikörpers ist ein Shift des Protein/Nukleinsäurekomplex im EMSA zu erkennen **(C).**

Zur Beantwortung der Frage, ob diese *in vitro* Beobachtungen *in vivo* relevant sind, wurden verschiedene NF-κB defiziente Mäuse (p52 -/-, p50 -/-) verwendet. Bei diesen Proteinen der Rel Familie fehlt die Transaktivierungsdomäne. Weiterhin wurde ein Mausstamm verwendet, der defizient für Bcl-3 ist. Bcl-3 gehört zur IκB-Familie und besitzt regulatorische Eigenschaften. Bcl-3 ist in der Lage NF-κB Komplexe aus dem Zellkern zu transportieren. Weiterhin kann Bcl-3 mit Proteinen der Rel Familie Komplexe bilden und selbst als Transkriptionsfaktor fungieren. Die Bcl-3 -/- und die p52 -/- Mäuse besitzen den gleichen genetischen Hintergrund wie C57Bl/6 Mäuse, die in diesen Experimenten als Kontrolle fungierten. Da bei den p50 -/- Mäusen der genetische Hintergrund nicht eindeutig war, wurden Mäuse, die für p50 heterozygot sind (p50 +/-) als Kontrollen verwendet.

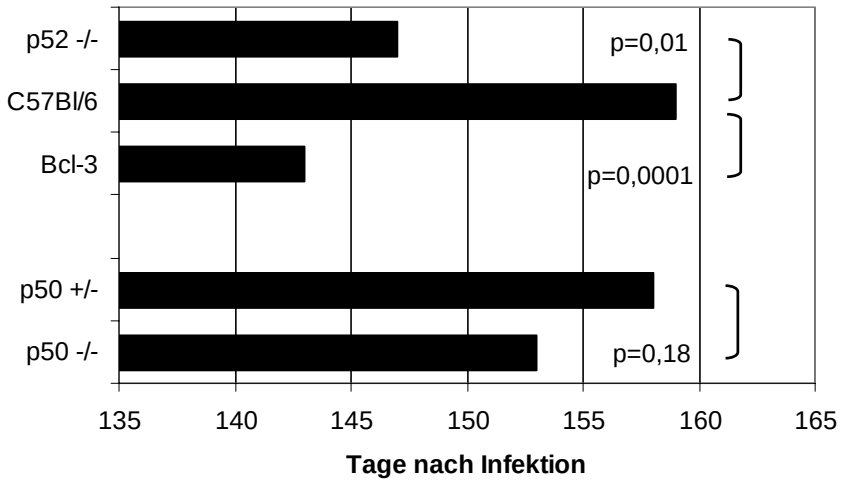


Abb. 7: Zeitpunkt nach intrazerebraler Infektion von NF-κB defizienten Mäusen mit 30 µl RML6 (0,02%) i.c., an dem die Tiere starben, bzw. in einem moribunden Zustand getötet wurden.

Nach intrazerebraler Infektion dieser Mäuse mit RML6 erkrankten die Bcl-3 -/- und p52 -/- Mäuse im Vergleich zu den C57Bl/6 Kontrollmäusen signifikant früher. Im Mittel starben bereits nach 143 Tagen die Bcl-3 -/- Mäuse und nach 147 Tagen die p52 -/- Mäuse, oder sie mussten in einem moribunden Zustand getötet werden. Die Kontrollmäuse hingegen erlagen erst nach 159 Tagen ihrer Erkrankung. Im Gegensatz dazu war kein Unterschied im Beginn der Erkrankung bei p50 -/- (Tag 153 p.i.) im Vergleich zu den heterozygoten Kontrollen (Tag 158 p.i.) zu erkennen (Abb. 7). Zur Untersuchung der Ursache für den früheren Beginn der Erkrankung bei Bcl-3 -/- und p52 -/- Mäusen, wurden die Gehirne aller Mäuse histologisch und immunhistologisch untersucht. Weiterhin wurden die Gehirne in der Western Blot Analyse auf Anwesenheit von pathologischem Prionprotein untersucht. Histologisch gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Stärke der spongiformen Veränderungen. Auch in der Western Blot Analyse gab es keine Anzeichen auf vermehrte oder verminderte Produktion von pathologischem Prionprotein. Erst mit Hilfe der Immunhistologie konnten Unterschiede zwischen NF-κB defizienten und Kontrollmäusen festgestellt werden. Die Gehirnschnitte wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen gespaltene Caspase-3, einem Apoptosemarker, gefärbt. In Gehirnen der NF-κB defizienten Mäuse war im Vergleich zu den Kontrollmäusen deutlich mehr Apoptose-Signale, insbesondere in den Gebieten der spongiformen Veränderungen, zu finden (Abb. 8). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die verstärkte Apoptose von Zellen im Zentralnervensystem bei der vorzeitigen Erkrankung der NF-κB defizienten Mäuse beteiligt sein könnte.

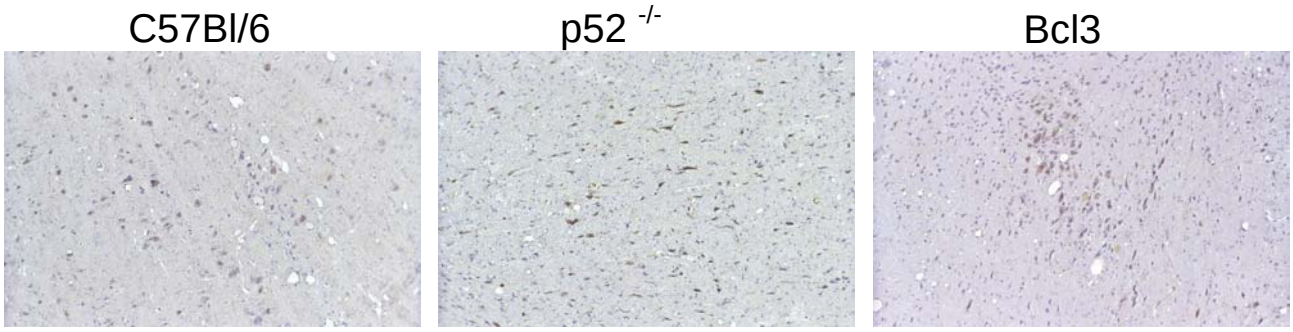


Abb. 8: Immunhistologisch konnte verstärkt Apoptose, nachgewiesen mit einem Antikörper gegen den Apoptosemarker gespaltene-Caspase 3, in Gehirnschnitten von RML6 terminal erkrankten p52-/- Mäusen und Bcl-3 Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6 Kontrollmäusen festgestellt werden.

In weiteren immunhistologischen Untersuchungen konnten wir eine drastische Reduktion bis hin zu einem kompletten Verlust der phospho-p65 spezifischen Färbung im Gehirn RML6 infizierter Mäuse beobachten, unabhängig, ob es sich hierbei um NF-κB defiziente oder Kontrolltiere handelte. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde eine Kinetik nach RML6 Infektion von C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. Bereits eine Woche nach Infektion war eine deutliche Reduktion der phospho-p65 positiven Zellen im Gehirn feststellbar. Aufgrund dieser Untersuchungen lässt sich vermuten, dass die NF-κB Aktivität durch die RML6 Infektion in C57Bl/6 Mäusen gehemmt wird. Diese *in vivo* Untersuchungen korrelieren mit unseren *in vitro* Ergebnissen, in denen wir zeigen konnten, dass NF-κB nach RML-6 Infektion als p50/p50 Homodimer vorliegt und somit nicht in der Lage ist, anti-apoptotische Zielgene zu aktivieren.

Aufgrund unserer Ergebnisse lässt sich folgender möglicher Mechanismus postulieren (Abb. 9): In einer normalen Zelle existiert NF-κB hauptsächlich als p65/p50 Heterodimer. Die Untereinheit p65 besitzt eine Transaktivierungsdomäne. Dies führt dazu, dass es nach Bindung von p65/p50 an die κB Bindestelle zur Aktivierung NF-κB spezifischer Zielgene kommt. NF-κB reguliert eine Vielzahl von Genen, die für anti-apoptotische Proteine kodieren (z.B. IAP-Familie, Bcl-Familie), die apoptotischen Prozessen entgegen wirken können und im Fall einer neuronalen Zelle somit neuroprotektiv wirken. Allerdings ist auch in einer normalen Zelle u.a. das NF-κB p50/p50 Homodimer zu finden, was prinzipiell die Genexpression blockiert, da p50 keine Transaktivierungsdomäne besitzt. Somit bleibt eine Aktivierung anti-apoptotischer Zielgene aus. Normalerweise kann aber der p50/p50 Homodimer-Komplex durch den p65/p50 Heterodimer-Komplex verdrängt werden. Weiterhin besitzt Bcl-3 Kerntransportfunktionen und ist in der Lage, den p50/p50 Homodimer-Komplex aus dem Kern zu transportieren. Somit wäre die κB Bindestelle wieder für den p65/p50 Heterodimer-Komplex zugänglich.

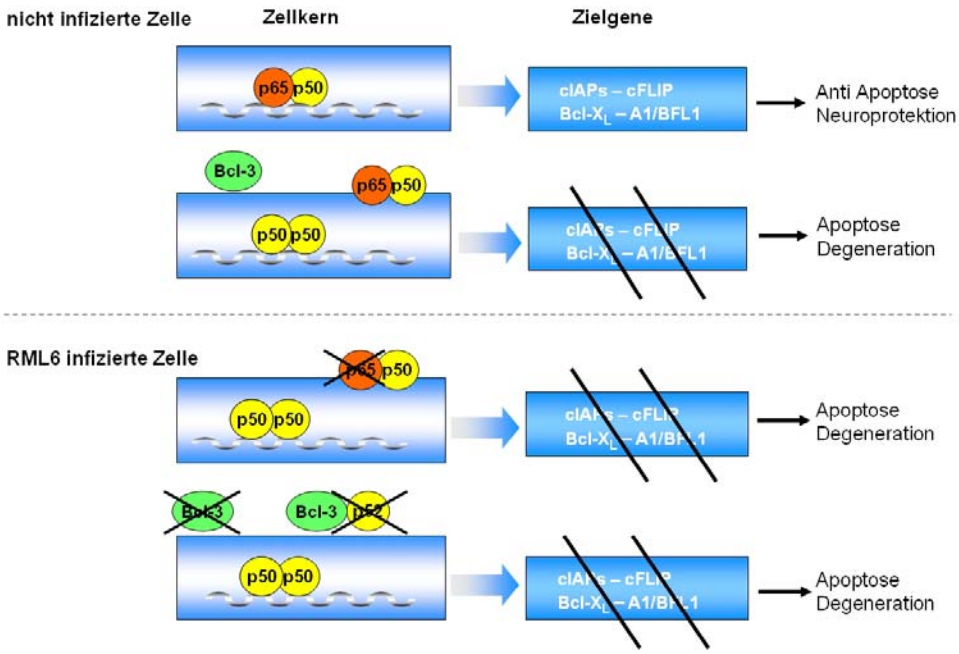


Abb. 9: Schematische Darstellung eines möglichen Mechanismus, wie es zur Apoptose nach RML6 Infektion im Gehirn kommen könnte.

Entscheidend für die Erklärung des Pathogenesemechanismus ist die Tatsache, dass in einer Scrapie (RML6) infizierten Zelle *in vitro* und *in vivo* kein aktiviertes p65 gefunden werden konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *in vitro* auch kein RelB bzw. c-Rel - beide besitzen Transaktivierungsdomänen - im Kern infizierter Zellen vorliegt. Die EMSA Untersuchungen zeigten, dass nach RML6 Infektion von N2A Zellen nur der NF-κB p50/p50 Homodimer-Komplex im Kern nachweisbar ist. Dieser ist wie bereits erwähnt nicht in der Lage, anti-apoptotische Zielgene zu aktivieren. Als Folge kommt es zur Apoptose und im weiteren Verlauf der Infektion zu degenerativen Prozessen. Apoptose konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen im Gehirn Scrapie infizierter Mäuse und im Gehirn CJD infizierter Patienten nachgewiesen werden. Ausgehend von unseren Untersuchungs-ergebnissen erklären wir den schnelleren Ausbruch der Erkrankung bei Bcl-3 und p52 defizienten Mäusen damit, dass wahrscheinlich in der frühen Phase der Infektion diese Proteine nicht mehr dem Apoptose Prozess entgegen wirken können.
Aufgrund dieser Untersuchungen postulieren wir, dass die fehlende Funktion von NF-κB als Transkriptionsfaktor die Pathogenese von Prion-Erkrankungen beeinflusst, da nach Infektion NF-κB anscheinend nicht mehr in der Lage ist, die Expression anti-apoptotischer Gene zu induzieren. Eine Wiederherstellung der p65/p50 Aktivität könnte daher möglicherweise die Neurodegeneration verhindern.

Die Literatur kann zusammen mit dem Text bei dem Autor angefordert werden.

6 INSTITUT FÜR EPIDEMIOLOGIE: SCHWEINEPEST BEI WILDSCHWEINEN - EINE SUVEILLANCE DATENBANK FÜR BELGIEN, DEUTSCHLAND, FRANKREICH, LUXEMBURG UND DIE NIEDERLANDE

Klöß, D., Kramer, M., Kranz, P., Kroschewski, K., Schröder, R. und Staubach, C.*

Zusammenfassung

Im September 2002 wurde am Institut für Epidemiologie in enger Kooperation mit der DG SANCO-Arbeitsgruppe zur Schweinepest bei Wildschweinen der Europäischen Kommission die Entwicklung eines einzeltierbasierten Datenbanksystems zur Darstellung der epidemiologischen Situation der Schweinepest bei Wildschweinen in Belgien, Teilen Deutschlands (Bundesländer Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz und Saarland), Frankreich, Luxemburg und den Niederlanden begonnen.

Eine der wichtigsten Aufgaben dieses Projektes war die transparente Darstellung der epidemiologischen Situation der Schweinepest bei Wildschweinen, insbesondere in den Grenzregionen zwischen den beteiligten Ländern, um möglichst kurzfristig adäquate Bekämpfungsmaßnahmen bei bestimmten Gefährdungslagen durchführen zu können. Weiterhin dient die Datenbank der Arbeitsgruppe zur Schweinepest bei Wildschweinen der Europäischen Kommission als Grundlage für Empfehlungen zur Seuchenbekämpfung an den Ständigen Ausschuss für die Lebensmittelkette (Tiergesundheit) der Europäischen Kommission und die jeweiligen Mitgliedsländer sowie als Basis für eine umfangreiche Risikoanalyse in Raum und Zeit. Eine Erweiterung der Datenbank auf andere Bundesländer, weitere Mitgliedsstaaten der EU oder assoziierte Länder ist möglich.

Einleitung

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine der gefährlichsten Tierseuchen bei Schweinen und hat in den letzten 10 Jahren innerhalb der EU erhebliche ökonomische Verluste verursacht. Die Überwachung erwies sich als schwierig, zumal das Virus der KSP auch von Wildschweinen (*Sus scrofa scrofa*) auf Hausschweine übertragen wurde (Laddomada, 2002, Artois *et al.*, 2002). Im Jahr 2002 wurden der Europäischen Kommission KSP-Fälle aus Belgien, Frankreich, Deutschland und Luxemburg gemeldet. Die meisten Ausbrüche waren auf Wildschweine begrenzt, einige Fälle traten jedoch auch bei Hausschweinen auf. Diese konnten mit hoher Sicherheit auf Grund der genotypischen Differenzierung auf Infektionen in der lokalen Wildschweinpopulation zurückgeführt werden. Große Aufmerksamkeit wurde der Schweinepest bei Wildschweinen in den Bundesländern Rheinland-Pfalz, Nordrhein-Westfalen und dem Saarland sowie entlang der Grenzen zu Belgien, Frankreich und Luxemburg gewidmet. Aus den Niederlanden liegen bisher keine Nachweise vor, die auf ein Vorkommen von KSP-Infektionen bei Wildschweinen schließen lassen, jedoch wurden einige Regionen in die Überwachungsgebiete integriert (Artois et al., 2002). Damit die epidemiologischen Informationen über KSP bei Wildschweinen schnell und regelmäßig zwischen den Behörden der betroffenen Regionen und den Experten der fünf EU-Mitgliedsstaaten ausgetauscht werden können, wurde eine Datenbank entwickelt (European Commission, 2003).

Prinzip der Datenbank

Die Datenbank wurde als Internet-Projekt realisiert und erlaubt die Dateneingabe sowie die Auswertung der Untersuchungsdaten über einen Internet-Browser (Abb. 1-4). Der Zugriff auf die Internet-Seite ist durch Sicherheitsmechanismen geschützt. Die Nutzer müssen sich über Nutzernamen und Passwörter eindeutig authentifizieren. Alle von den genannten EU-Mitgliedsländern benannten Benutzer der Datenbank können den Datenbankinhalt lesen und auswerten, aber nur eine für jedes EU-Mitgliedsland 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 des Fund- oder Erlegungsortes) sowie die Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchung (Virologie und/oder Serologie). Diese kann sowohl über eine HTML-Maske im Browser als auch durch Übertragung von Textdateien für größere Datenmengen erfolgen. Die Daten des jeweils eigenen Landes können ebenfalls von der Datenbank heruntergeladen werden. Für die Übertragung und das Herunterladen von Daten wurden entsprechende Schnittstellen zu den Datenbanksystemen der Untersuchungseinrichtungen geschaffen (Abb. 1).

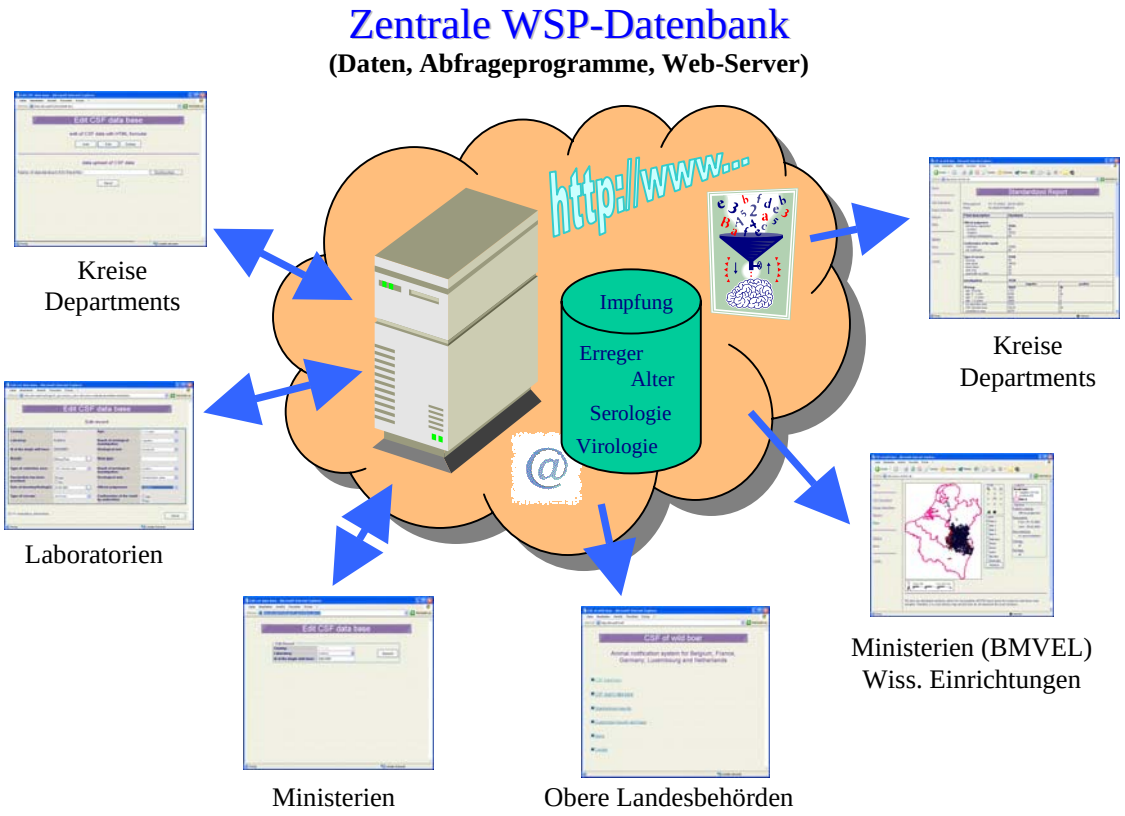


Abb. 1 Prinzip der Datenbank

Struktur der Datenbank

A) Einzeltierdaten

Die epidemiologischen Daten für jedes erlegte oder tot gefundene Wildschwein werden in der zentralen KSP-Datenbank in einem Datensatz gespeichert (Abb. 2). Der Datensatz gliedert sich in drei Bereiche:

- Identifikation des Wildschweins
  - eindeutiger Identifikationsschlüssel für jedes Wildschwein
  - Gemeinde
  - Erlegungs- bzw. Funddatum
  - Alter, Geschlecht, Todesursache

- Laborresultate
  Virologisches Ergebnis mit Testmethode und ggf. Virustyp
  Serologisches Ergebnis mit der Testmethode
- Offizielle Bewertung des Resultats (eine Option für übergeordnete Behörden)

B) Gebietsdaten

Um die Ergebnisse der Laboruntersuchung in Beziehung zu den KSP-gefährdeten Gebieten, Überwachungs-, Beobachtungs-, Impf- und/oder Verbreitungsgebieten setzen zu können, werden auch diese Informationen in der Datenbank gespeichert. Es wird für jedes Gebiet und die dazu gehörende Zeitperiode in der zentralen Gebietsdatenbank ein einzelner Datensatz angelegt (Abb. 2). Der Datensatz gliedert sich in die folgenden drei Bereiche:

- Identifikation des Gebietes, der Gebietsart sowie des Anfangs- und Enddatums der validen Zeitperiode
- Geschätzte Anzahl der Wildschweine, zusätzlich die Anzahl erlegter Wildschweine und das Datum der letzten Impfung
- Geographische Daten

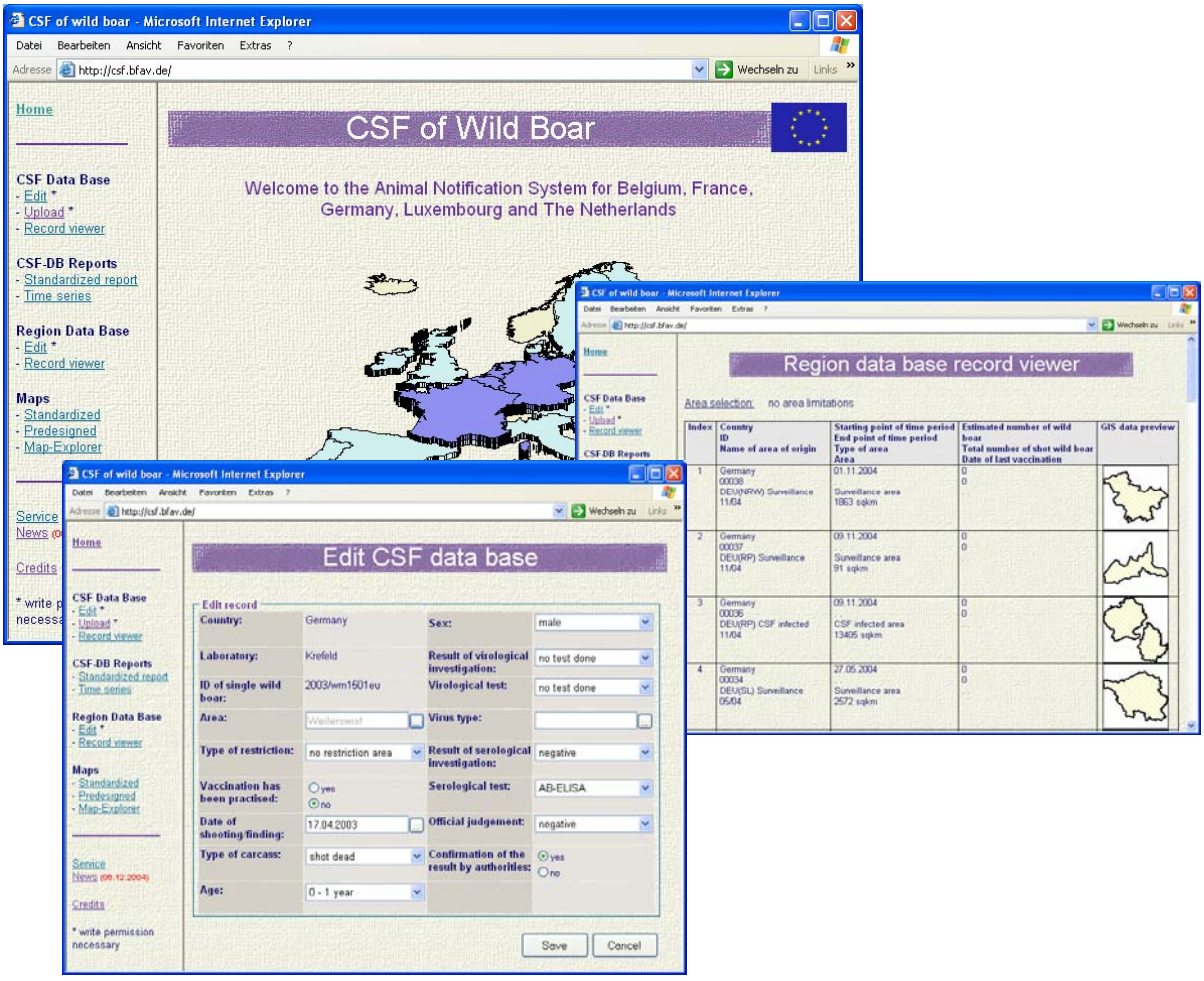


Abb. 2 Dateneingabe

Auswertung und Visualisierung der Daten

Die Auswertung und Visualisierung der Datenbank erfolgt HTML-basiert im Internet-Browser. Neben der tabellarischen und graphischen Auswertung erlaubt ein Internet-Kartenserver auch die Darstellung der Untersuchungsergebnisse in Form von Karten unter Berücksichtigung der administrativen Grenzen und der topographischen Gegebenheiten. Für die nachfolgenden Auswertungen und Darstellungen der Daten stehen Auswahlparameter für die regionale, zeitliche oder inhaltliche Eingrenzung der Datensätze zur Verfügung.

Berichte

Eine tabellarische Darstellung der kumulierten Werte von Untersuchungsergebnissen stratifiziert nach Alter, Todesursache und Gebietsart erlaubt die zusammenfassende Bewertung der Surveillance in den einzelnen oder mehreren Mitgliedsstaaten auf verschiedenen regionalen Ebenen (Abb. 3). Ein weiterer Bericht in Form eines Balkendiagramms über die Anzahl der Untersuchungen oder der virologischen bzw. serologischen Prävalenz pro Zeiteinheit (z.B. Monat, halbes Jahr) gibt Auskunft über die zeitliche Verteilung der Proben und Ergebnisse (Abb. 3). In beiden Berichten ist es möglich, Prävalenzen und die zugehörigen 95%-Konfidenzintervalle für die verschiedenen Kriterien (z.B. Alter, Gebietsart und Impfung) zu berechnen (Abb. 3). Dies erleichtert die explorative Analyse und Interpretation erheblich, vor allem im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf.

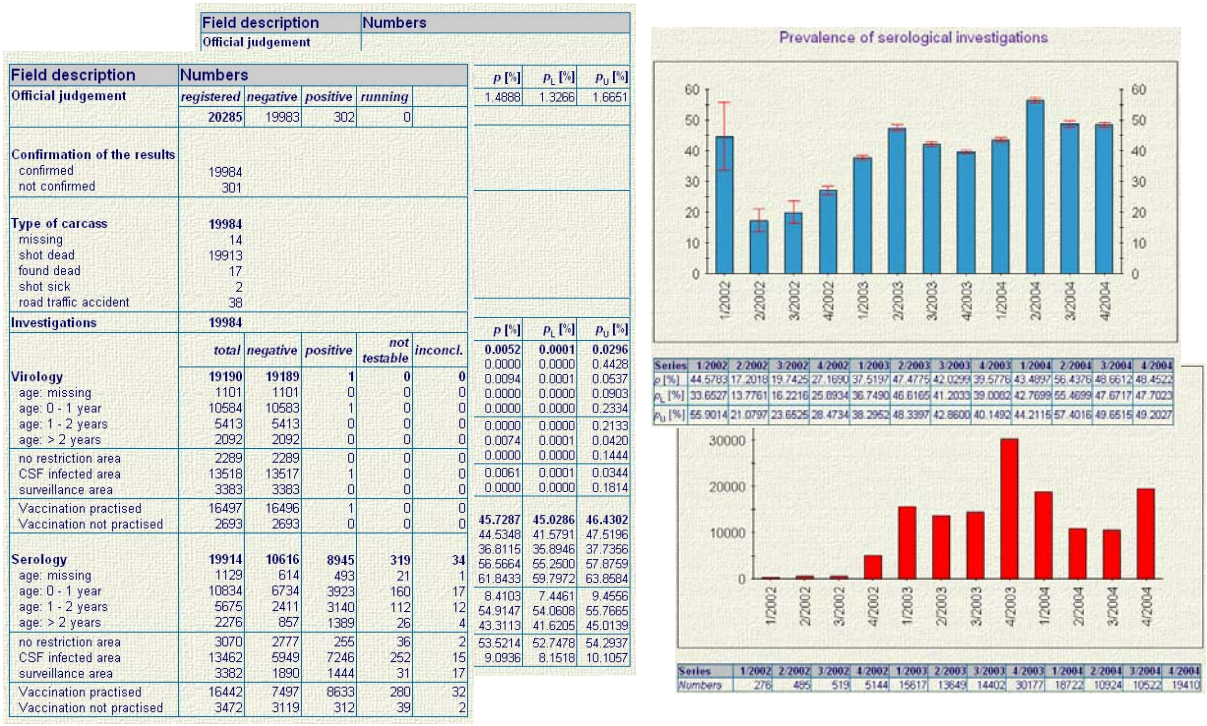


Abb. 3 Berichte

Karten

Neben der statischen Darstellung der Restriktions- und Impfgebiete ermöglicht ein Internet-Kartenserver die dynamische Erzeugung von Karten auf der Basis der administrativen Grenzen der teilnehmenden Mitgliedsstaaten. Das Geographische Informationssystem (GIS)

auf dem Server generiert jeweils getrennte Karten für die virologischen und serologischen Untersuchungsergebnisse. Dabei stellt ein Punkt, welcher in Abhängigkeit von dem Untersuchungsergebnis unterschiedlich eingefärbt wird, jedes einzelne untersuchte Wildschwein dar. Dessen geographische Position wird zufällig innerhalb der jeweiligen Gemeinde, in der das Tier erlegt oder tot aufgefunden wurde, bestimmt. Dabei wird die Annahme zugrunde gelegt, dass das Habitat eines Wildschweins im Wesentlichen der Größe einer Gemeinde entspricht. Weiterhin können in thematischen Kartendarstellungen die Laborresultate mit den Gebietsdaten kombiniert werden, wobei eine nachträgliche Einfärbung oder Beschriftung der einzelnen übermittelten Gebietskulissen nach verschiedenen Kriterien möglich ist. Zur weitergehenden Darstellung und Analyse ist es möglich, die großen Flüsse, Seen, Städte, Straßen sowie eine Wald- bzw. Höhenschicht einzublenden (Abb. 4).

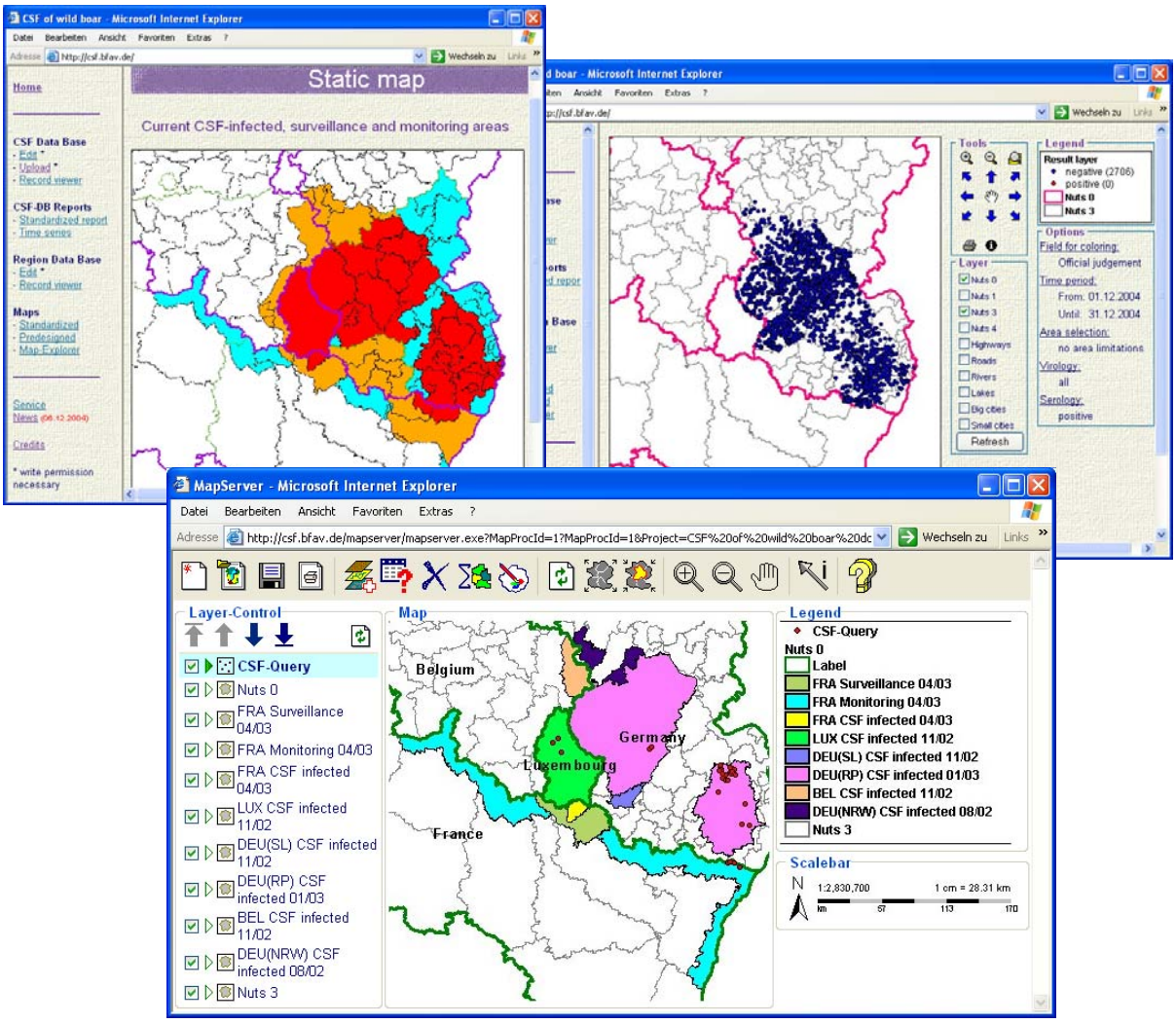


Abb. 4 Karten

Umsetzung

Die teilnehmenden Mitgliedsstaaten an der Surveillance Datenbank zur Überwachung des Schweinepestgeschehens bei Wildschweinen haben bis zum 31. Dezember 2004 140.194 Datensätze (Stand 25.01.2005) in der zentralen KSP-Datenbank erfasst (Tab. 1 und Abb. 5).

Insgesamt wurden in diesem Zeitraum 35 Gebiete in die zentrale Gebietsdatenbank eingestellt (Tab. 1). Damit bietet die Datenbank:

- Eine transparente Darstellung der epidemiologischen Situation der Schweinepest bei Wildschweinen zwischen den beteiligten Ländern
- Eine aktuelle Übersicht über das Infektionsgeschehen einzelner Länder
- Auswertungen in Zeit und Raum unter Berücksichtigung von Restriktions- und Impfgebieten
- Vorteile in der wissenschaftlichen Einschätzung der Situation in unterschiedlichen Gebieten
- Eine Erleichterung bei der Erstellung von Berichten

Mitglieds-staat	Anzahl registrierter Datensätze	Anzahl untersuchter Tiere	Anzahl virologischer Untersuchungen	Anzahl serologischer Untersuchungen	Anzahl registrierter Regionen
Belgien	4.186	4.156	4.129	3.265	3
Frankreich	9.047	8.759	4.833	6.911	9
Deutschland	116.665	116.566	108.979	116.209	21
Luxemburg	10.110	10.107	10.077	9.024	2
Niederlande	629	629	0	629	0
Summe	**140.637**	**140.217**	**128.018**	**136.038**	**35**

Tab. 1 Anzahl Datensätze 1. Januar 2002 – 31. Dezember 2004 (Stand 26.01.2005)

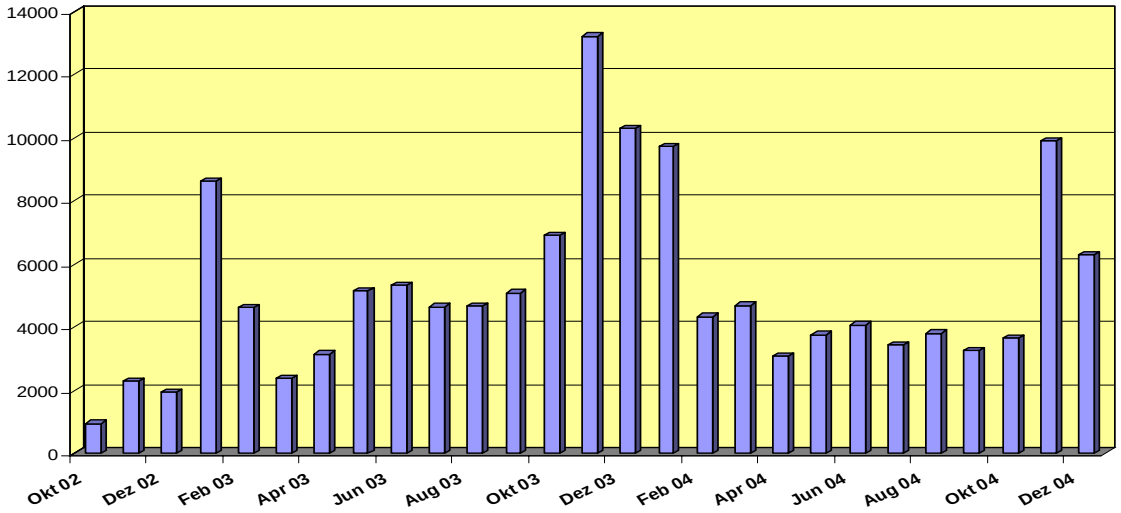


Abb. 5 Anzahl Datensätze 1. Oktober 2002 – 31. Dezember 2004 (Stand 26.01.2005)

Ausblick

Geplant ist die Erweiterung der Datenbank um weitere Mitgliedsländer der EU, Bundesländer der Bundesrepublik Deutschland und Drittstaaten. Die in Zukunft mögliche Darstellung von Karten, bei denen der Schätzwert für die virologische bzw. serologische Prävalenz pro Gemeinde oder Kreis für die Stichprobengröße korrigiert ist, soll die explorative Datenanalyse auch im Raum erleichtern. Um eine noch detailliertere Analyse der Untersuchungsergebnisse zu ermöglichen, sollen die Parameter für die tabellarischen Auswertungen und Kartendarstellungen an Hand von Nutzervorschlägen erweitert werden. Weiterhin ist eine wissenschaftliche Auswertung der Datenbank im Rahmen von EU- bzw. hausinternen Projekten vorgesehen.

Literatur

ARTOIS, M., DEPNER, K.R., GUBERTI, V., HARS, J., ROSSI, S. & RUTILI, D. (2002) Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz., **21(2)**, 287-303.

EUROPEAN COMMISSION (2003) On the financial assistance to Germany for the collection of epidemiological information on classical swine fever in feral pigs. Decision 2003/257/EC.

LADDOMADA, A. (2002) Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. Veterinary Microbiology, **73**, 121-130.

7 INSTITUT FÜR BAKTERIELLE INFEKTIONEN UND ZOONOSEN: DIAGNOSTIK UND BEKÄMPFUNG DER BOVINEN GENITALEN CAMPYLOBACTERIOSE

Schulze, F.*, Hotzel, H. und Müller, W.

Einleitung

Das Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen betreibt das Referenzlabor für die Vibrionenseuche der Rinder. Gesetzliche Grundlage für die Arbeiten ist die Verordnung zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder vom 03.06.1975 (BGBl. I, S. 1307). Der alte Begriff "Vibrionenseuche" ist heute irreführend und überholt. Er stammt noch aus der Zeit, in der die jetzt als *Campylobacter* (*C.*) bezeichneten Keime (Abb. 1) mit den sogenannten "echten" Vibrionen in einer Gattung zusammengefasst wurden. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist diese Infektionskrankheit als bovine genitale Campylobacteriose (bgC) zu bezeichnen.

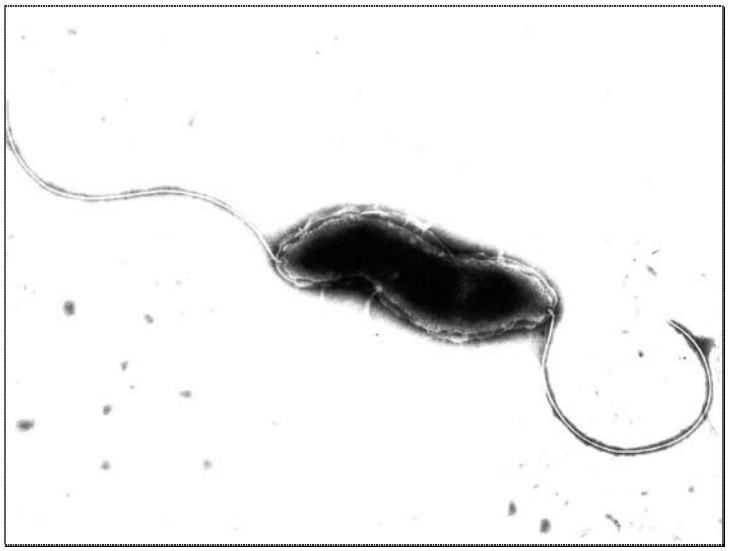


Abb. 1: *C. jejuni* 132 aus Kälberlabmagen, gebogenes bipolar begeißeltes Stäbchen, Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure. Aufnahme H. Günther, Vergr. 1 : 18.000

Klinische Symptomatik

Die bgC ist eine venerische Erkrankung, bei der Bullen meist keine klinischen Symptome zeigen. Bei weiblichen Tieren sind geringe entzündliche Veränderungen im Scheiden- und Gebärmutterbereich zu beobachten. Hauptsymptome sind frühe embryonale Mortalität, Aborte in jedem Trächtigkeitsstadium und Infertilität. Nach der ersten Infektion im Bestand verläuft die Seuche akut mit plötzlichem Rückgang der Aufnahmerate (z.T. unter 10 %). Im Verlauf der Zeit tritt die Seuche ins chronische Stadium ein und die älteren Tiere erlangen nach und nach ihre ursprüngliche Fruchtbarkeit wieder.

Erreger

Der Erreger dieser Erkrankung ist *C. fetus* ssp. *venerealis*. Der Keim hat sein natürliches Reservoir im Präputialsack klinisch gesunder Bullen, doch kann er Aborte verursachen (enzootischer Abort, anzeigepflichtig). Davon abzutrennen sind Infektionen mit *C. fetus* ssp. *fetus*. Dieser Keim hat seinen natürlichen Standort im Intestinaltrakt des Rindes, kann aber ebenfalls Aborte auslösen (sporadischer Abort). Während *C. fetus* ssp. *venerealis* einen ausgeprägten Tropismus für die Genitalschleimhaut des Rindes aufweist, in dessen Intestinaltrakt nicht überleben kann und bisher äußerst selten mit menschlichen Erkrankungen in

Zusammenhang gebracht wurde, ist die Rolle von *C. fetus* ssp. *fetus* völlig anders einzuschätzen. Hierbei handelt es sich um einen Zoonoseerreger, dessen wahre Bedeutung nur unzureichend bekannt ist (Blaser, 1998). Beim Menschen verursacht er seltene, aber überwiegend schwerwiegende Erkrankungen mit zumeist septikämischem Charakter. Der Keim wurde bei Aborten, Endokarditis, Meningitis, Cellulitis, Bakteriämie, Implantat-assoziierten Infektionen und Enteritis nachgewiesen.

Epidemiologische Ausgangssituation

Da die bgC in ihrer Epidemiologie weder an besondere Überträger noch an klimatische Bedingungen irgendwelcher Art gebunden ist, kann sie – durch Handel und Verkehr verbreitet – in allen Ländern auftreten, in denen Rinderzucht betrieben wird. In Deutschland gelang es mit der Einführung der künstlichen Besamung und dem Aufbau eines effektiven Bullengesundheitsdienstes, diese Infektionen entscheidend zurückzudrängen. Derzeit ist die Bundesrepublik – von sporadischen Ausbrüchen abgesehen – frei von diesem Erreger. Der Schutz der Rinderbestände vor der Einschleppung des Erregers und der Erhalt dieser günstigen epidemiologischen Situation sind im Interesse aller Rinderhalter. Dies erfordert insbesondere eine präzise Erregerdiagnostik und exakte Umsetzung seuchenprophylaktischer Maßnahmen.

Übertragung des Erregers

Zweifellos ist der natürliche Deckakt der unmittelbarste Übertragungsweg, der auch ein besonders leichtes Angehen der Infektion zur Folge hat. Da klinisch gesunde Bullen die Erreger im Samen enthalten können, besteht auch die Gefahr der Erregerübertragung durch künstliche Besamung. Bei der prophylaktischen Behandlung des Spermas auf Besamungsstationen erbrachte die Zugabe von Antibiotika zu infiziertem Samen keine einheitlichen Befunde. Eine Zusammenstellung älterer Untersuchungen findet sich bei Mitscherlich (1981). In Abhängigkeit von den verwendeten Antibiotika und deren Konzentration, der Einwirkungszeit, der hierbei gehaltenen Temperatur, der Art des Verdünners und dem Grad der Samenverdünnung wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt, d.h. es kam nicht in jedem Fall zu einer zuverlässigen Erregerabtötung. Auch bei Temperaturen bis zu -190 °C wird *C. fetus* ssp. *venerealis* nicht inaktiviert. Die Zugabe von Antibiotika zum Samen bietet somit keine Gewähr dafür, dass die Seuche nicht mit infiziertem Samen von einer Besamungsstation aus verbreitet werden kann. In diesem Zusammenhang muss auch gesagt werden, dass die Untersuchung einzelner Portionen eines Ejakulates auf Erregerfreiheit auf Grund des hohen Verdünnungsgrades als riskant einzuschätzen ist, da falsch-negative Befunde nicht auszuschließen sind. Somit ist Samen, der von *C. fetus* ssp. *venerealis* positiven Bullen gewonnen wurde, als hochgradig bedenklich und mit einem hohen Risiko behaftet einzuschätzen. Nach der Deckinfektionen-Verordnung – Rinder (§ 4, Punkt 4, Satz 2) ist der Samen von seuchenkranken Besamungsbullen, soweit dieser nach Erkrankung der Bullen entnommen worden ist, unschädlich zu beseitigen.

Traditionelle Diagnostik

Die Unterschiede in der Epidemiologie und klinischen Bedeutung beider *C.-fetus*-Subspezies erfordern deren exakte Identifizierung und Differenzierung. Für die Diagnostik dieser Infektionskrankheit stehen Arbeitsanleitungen zur Verfügung. Auf nationaler Ebene sind dies die Arbeitsanleitungen zur Labordiagnostik von anzeigepflichtigen Tierseuchen (Stand November 2002). Richtungsweisend sind ebenfalls die Empfehlungen des OIE, enthalten in den Standards für diagnostische Tests und Vakzinen (Anonymus, 2004). Hier sind die traditionellen mikrobiologischen Verfahren der Erregerdiagnostik zusammengefasst, die die beiden Stufen Isolierung und Identifizierung sowie phänotypische Differenzierung umfassen. Generell ist zu sagen, dass *C. fetus* ssp. *venerealis* ein empfindlicher Keim ist, der außerhalb

seines natürlichen Lebensraumes sehr schnell abstirbt. Daher sollte der Zeitraum zwischen Probenentnahme und Anlegen der Proben sechs Stunden, nach anderen Angaben vier Stunden nicht überschreiten. Sofern das nicht gewährleistet werden kann, sind die Proben in Transport- und Anreicherungsmedien zu verbringen. Hier wird in den letzten Jahren vor allem das sogenannte Weybridge-Medium empfohlen. Als Selektivmedium hat sich Columbia-Agar mit Skirrow-Supplement bei gleichzeitigem Zusatz eines Antimykotikums bewährt. *Campylobacter*-Spezies wachsen in der Primärkultur – beeinflusst durch die Feuchtigkeit des Nährmediums – in zwei Wuchsformen als flache, grau glänzende Kultur mit Neigung zum Schwärmen und Zusammenfließen (Abb. 2) oder als runde, konvexe, glatte, glänzende Einzelkolonien von 1 - 3 mm Durchmesser (Abb. 3).

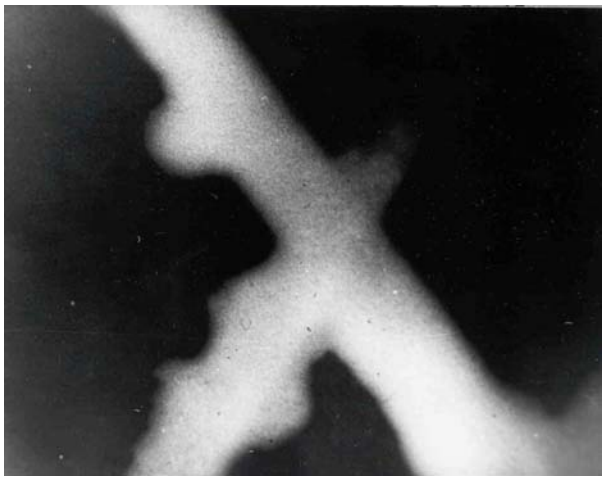


Abb. 2: *Campylobacter*-Primärkultur auf Preston-Selektivmedium; flache, grau glänzende Kultur, Ausbreitung entlang des Impfstriches

Abb. 3: *Campylobacter*-Primärkultur auf Preston-Selektivmedium; runde, konvexe, glatte, glänzende Einzelkolonien von 1-3 mm Durchmesser

C. fetus ssp. *venerealis* bildet nach 3 - 5 Tagen Bebrütung i.d.R. Einzelkolonien entsprechend Abbildung 3. Ebenso wie die Isolierung stellt auch die phänotypische Differenzierung der Erreger an das mikrobiologische Labor hohe Anforderungen und setzt entsprechende Erfahrungen voraus. Für die phänotypische Differenzierung der beiden *C.-fetus*-Subspezies stehen nur zwei Reaktionen, Glycintoleranz und Na-Selenit-Reduktion, zur Verfügung, wobei *C. fetus* ssp. *venerealis* in beiden Tests negativ reagiert. Doch ist die Aussage der Reaktionen eingeschränkt, da bei *C. fetus* ssp. *venerealis* Glycin-tolerante Varianten beschrieben wurden und einige Isolate in der Na-Selenit-Reduktion positiv reagierten. Umgekehrt sind bei *C. fetus* ssp. *fetus* Glycin-intolerante Varianten bekannt geworden. Daher stellt die nun möglich gewordene Differenzierung der beiden *C.-fetus*-Subspezies mittels PCR zweifellos den größten methodischen Fortschritt der letzten Jahre dar.

Molekularbiologische Differenzierung

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist die Differenzierung der beiden Subspezies wegen der engen Verwandtschaft auch auf DNA-Ebene sehr schwierig. So zeigen sowohl die 16S-rRNA-Gene als auch die der 23S rRNA als häufig zur Identifizierung verwendete speziesspezifische Genorte nahezu 100%ige Homologie. Trotzdem ist eine Differenzierung mittels PCR möglich. Dabei wird mit den Primern MG3F und MG4R ein 764-bp-Amplikon für beide Subspezies von *C. fetus* amplifiziert (Abb. 4). Die Differenzierung beider Subspezies erfolgt mit dem Primerpaar VenSF und VenSR, wobei nur bei *C. fetus* ssp. *venerealis* ein 142-bp-Amplikon erhalten wird (Abb. 5).

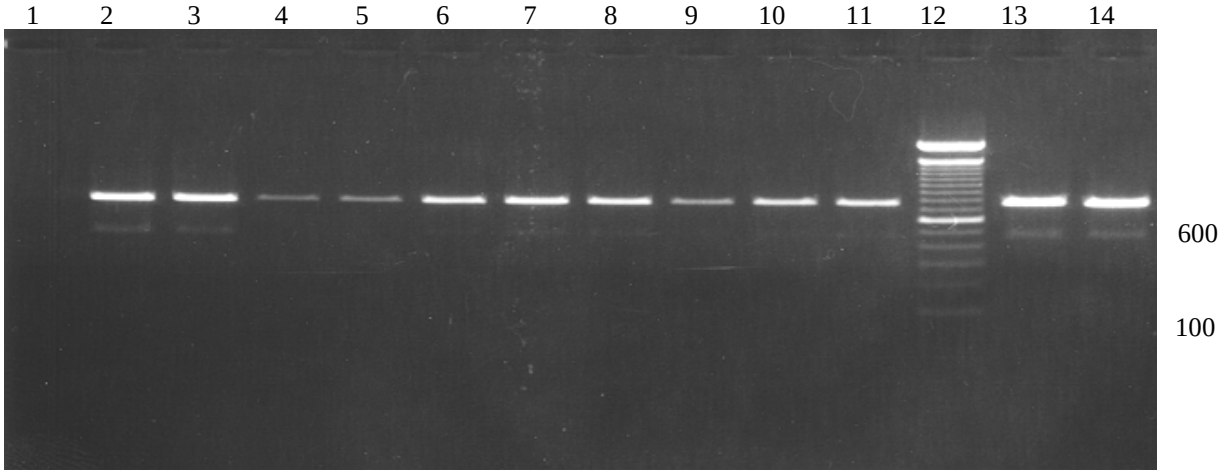


Abb. 4: Identifizierung der Spezies *C. fetus* mit den Primern MG3F/MG4R in der PCR
Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2-5: *C.-fetus*-ssp.-*fetus* Feldstämme 498/99, 499/99, 502/99 und 509/99,
Spur 6-11: *C.-fetus*-ssp-*venerealis*-Feldstämme 147/00-152/00, Spur 12: DNA-Marker (100 bp-Leiter),
Spur 13: Typstamm *C. fetus* ssp. *fetus* DSMZ 5361, Spur 14: Typstamm *C. fetus* ssp. *venerealis* NCTC 010354

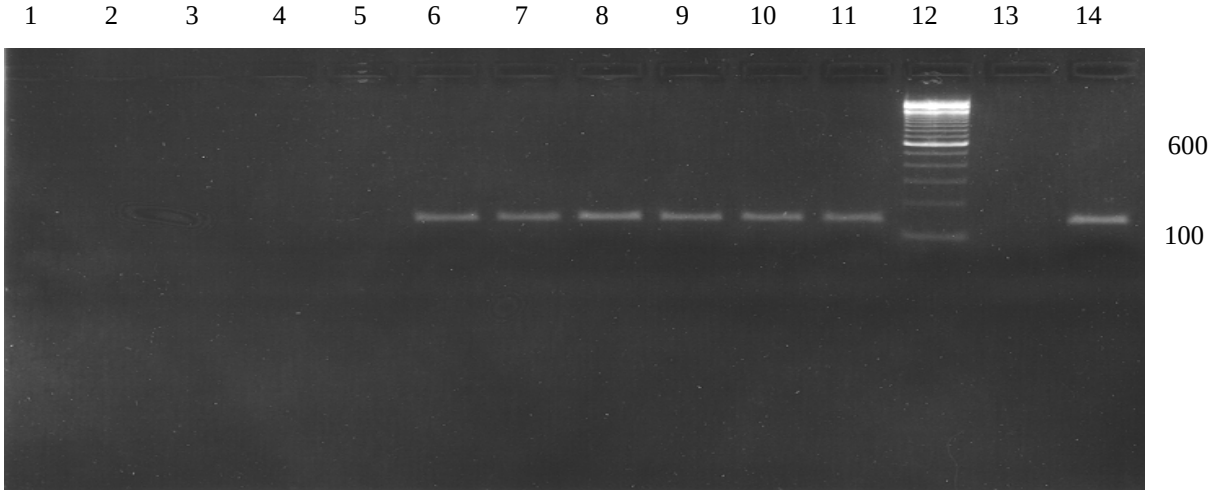


Abb. 5: Differenzierung der Subspezies *fetus* und *venerealis* mit dem Primerpaar VenSF/VenSR in der PCR
Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2-5: *C.-fetus*-ssp.-*fetus*-Feldstämme 498/99, 499/99, 502/99 und 509/99,
Spur 6-11: *C.-fetus*-ssp-*venerealis*-Feldstämme 147/00-152/00, Spur 12: DNA-Marker (100-bp-Leiter),
Spur 13 Typstamm *C. fetus* ssp. *fetus* DSMZ 5361, Spur 14: Typstamm *C. fetus* ssp. *venerealis* NCTC 010354

Die Typstämme der beiden Subspezies dienen als Positivkontrollen, unspezifische Reaktionen wurden nicht beobachtet. Dieser PCR-Assay hat sich bei der Untersuchung von 83 Feldisolaten bzw. Sammlungsstämmen (darunter 32 *C. fetus* ssp. *venerealis* und 27 *C. fetus* ssp. *fetus*) bewährt. Sofern für die *C.-fetus*-Feldstämme die Ergebnisse der mikrobiologischen Differenzierung vorlagen, konnten diese durch die PCR bestätigt werden. Wir halten aber auch weiterhin die traditionelle phänotypische Charakterisierung der *C.-fetus*-Subspezies für unverzichtbar, sehen aber in der PCR eine wertvolle Methode zur Ergänzung und Bestätigung dieser Befunde (Müller et al., 2003). Kürzlich wurde die Zuverlässigkeit dieser PCR in Frage gestellt (Anonymus, 2004). Aus diesem Grunde begannen wir eine Untersuchung zur Klärung dieser Frage. Für diesen Zweck vergleichen wir sieben phänotypische Schlüsselreaktionen (Empfindlichkeit gegen Glycin, Metronidazol, Cefoperazon, $KMnO_4$, basisches Fuchsin sowie Selenitreduktion und Wachstum bei 42° C), die von On u. Harrington (2001) empfohlen wurden, mit den Ergebnissen der PCR. Bisher wurden 62 *C.-fetus*-ssp.-*venerealis*- und 15

C.-fetus-ssp.-*fetus*-Feldisolate geprüft. Es konnten keine Diskrepanzen zwischen der PCR und den Ergebnissen der phänotypischen Differenzierung (besonders Resistenz gegen 1 % Glycin) beobachtet werden, allerdings erfordert die Standardisierung der phänotypischen Tests einen erheblichen Arbeitsaufwand.

Bekämpfung

Die Deckinfektionen-Verordnung – Rinder in Verbindung mit den dazugehörigen Ausführungshinweisen fasst die veterinärhygienischen Grundsätze, die bei der Bekämpfung der bgC zu beachten sind, zusammen. Auch aus heutiger Sicht besitzen diese Grundsätze volle Gültigkeit, wobei einige Aspekte nochmals hervorgehoben werden sollen. Danach hängen die zu treffenden Bekämpfungsmaßnahmen – Behandlung eines Bestandes oder einzelner Rinder – in entscheidendem Maße von der epidemiologischen Ausgangssituation im Rinderbestand ab (Ausführungshinweise zu § 7). Auf die im § 10, Absatz 4, Punkt 2a, b und c der Verordnung formulierten Anforderungen an unverdächtige Zuchtbullen muss nochmals hingewiesen werden. Danach sind Zuchtbullen unverdächtig, wenn

a) bei einer dreimaligen, in etwa zehntägigem Abstand durchgeführten mikrobiologischen Untersuchung von
   aa) Präputialspülflüssigkeit oder
   bb) Spülproben von der Innenwand der künstlichen Scheide unmittelbar nach der Samenentnahme
   und von Samenproben Erreger einer Deckinfektion nicht nachgewiesen wurden
b) bei einer klinischen Untersuchung Anzeichen, die das Vorliegen einer Deckinfektion befürchten lassen, nicht festgestellt wurden und
c) während des Zeitraumes der Untersuchung der Bulle abgesondert von weiblichen Tieren gehalten wurde.

An diesen Anforderungen muss unverzichtbar festgehalten werden. In ähnlicher Form finden sich die unter Punkt 2a) genannten Anforderungen im Anhang B Punkt 1e) iv (zweiter Stabsstrich) der Richtlinie 2003/43/EG unter Bedingungen für die Aufnahme von Tieren in zugelassene Besamungsstationen.

Es ist auch nochmals nachdrücklich zu unterstreichen (Erläuterung 25 zu § 11 der Deckinfektionen-Verordnung – Rinder), dass Maßnahmen gegen die bgC in jedem Fall angezeigt sind, wenn der Erreger nachgewiesen wurde. Dies entspricht der wirtschaftlichen Bedeutung der Seuche. Zu berücksichtigen ist ferner der teilweise "schleichende" Verlauf. Dies beinhaltet die Gefahr, dass das wahre Ausmaß der Ausbreitung erst spät erkannt wird.

Unter bestimmten Umständen, z.B. bei besonders wertvollen Zuchtbullen, kann nach § 7 der Deckinfektionen-Verordnung – Rinder in einem Rinderbestand, in dem eine Deckinfektion oder der Verdacht einer Deckinfektion amtlich festgestellt ist, eine Behandlung durch den Tierarzt erfolgen. Die Behandlung der Bullen gegen die bgC stellt eine wichtige Alternative dar, die bei der Mehrzahl der Tiere zum Erfolg führt (Mitscherlich, 1981). Das Verfahren ist arbeitsaufwändig, setzt eine erhebliche Sorgfalt und Erfahrung sowie eine gute Zusammenarbeit mit der Untersuchungseinrichtung voraus. Unabhängig von der Behandlungsmethode muss der Heilerfolg in jedem Fall durch die mehrmalige kulturelle Untersuchung von Vorsekret, Sperma und Präputialspülflüssigkeit des betreffenden Bullen sowie durch den Färsenübertragungsversuch überprüft werden. In behandlungsresistenten Fällen ist die Schlachtung anzuraten.

Gegebenenfalls kann auch eine aktive Immunisierung der Bullen (z. B. mit Vibrovax, CSL Limited, Parkville 3052 Victoria, Australia) in Erwägung gezogen werden. Die Erfahrungen belegen, dass neben einer prophylaktischen Wirkung auch ein "therapeutischer" Effekt zu erzielen ist.

Zusammenfassung
Da die bgC in vielen Beständen seit Jahren nicht mehr nachgewiesen wurde, wird sie von vielen Rinderhaltern (und vielleicht auch manchen Tierärzten) in ihrer Bedeutung unterschätzt. Die Überwachung auf Freiheit von dieser Tierseuche stellt aber nach wie vor eine aktuelle Aufgabe dar.
Die in den letzten Jahrzehnten erzielten Erfolge bei der Bekämpfung der bgC belegen, dass die zur Verfügung stehenden Instrumentarien – bei sachgerechter Anwendung – eine erfolgreiche Bekämpfung dieser Deckinfektion erlauben. Diese Erfolge sind nur bei enger Zusammenarbeit zwischen der Untersuchungseinrichtung und den im Rinderbestand tätigen Mitarbeitern möglich. Ebenso wie die Isolierung stellt auch die phänotypische Differenzierung von *C. fetus* ssp. *venerealis* an das mikrobiologische Labor hohe Anforderungen und setzt entsprechende Erfahrungen voraus. Neben dieser exakten Diagnose kommt der konsequenten Umsetzung der in der Deckinfektionen-Verordnung – Rinder formulierten Bekämpfungsmaßnahmen entscheidende Bedeutung zu.
Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist die erfolgreiche Bekämpfung der bgC nur mit *C.-fetus*-ssp.-*venerealis*-freien Bullen möglich. Das bezieht sich auf den natürlichen Deckakt und gleichermaßen auf die künstliche Besamung. Bei beiden Verfahren sind die gleichen Anforderungen an den Gesundheitsstatus der Tiere zu stellen. Jedes Abweichen von dieser Prämisse birgt unkalkulierbare, nicht vertretbare Risiken. Wie die in der Richtlinie 2003/43/EG formulierten tierseuchenrechtlichen Anforderungen belegen, besteht hierin in der europäischen Gemeinschaft länderübergreifender Konsens. Dieser Konsens beruht auf jahrzehntelangen Erfahrungen, die bei der Bekämpfung der bgC gesammelt wurden. Uns liegen keine Hinweise vor, die in absehbarer Zeit ein Abweichen von diesem Konzept denkbar erscheinen lassen.

Literatur

Anonymus: Bovine genital Campylobacteriosis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Fifth Edition, pp. 439-450, 2004

BLASER, M. J.: *Campylobacter fetus* - Emerging infection and model system for bacterial pathogenesis at mucosal surfaces (Clin. Infect. Dis. 27, 256-258, 1998)

MITSCHERLICH, E.: *Campylobacter* und *Vibrio*. In: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band III, S. 1-74. Hrsg. H. Blobel und T. Schließer, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1981

MÜLLER, W., HOTZEL, H., SCHULZE, F.: Identifizierung und Differenzierung der *Campylobacter-fetus*-Subspezies mittels PCR (Dtsch. tierärztl. Wschr. 110, 55-59, 2003)

ON, S. L.W. und HARRINGTON, C. S.: Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods (J. Appl. Microbiol. 90, 285-293, 2001)

Verordnung zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder (Rinder-Deckinfektionen-Verordnung) vom 3. Juni 1975 (BGBl. I, S. 1307). Geändert durch Verordnung zur Bereinigung tierseuchenrechtlicher Vorschriften vom 23. Mai 1991 (BGBl. I, S. 1151). 69. Erg. Tierseuchenrechtliche Vorschriften

Ausführungshinweise zur Verordnung zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder (Deckinfektionen-Verordnung – Rinder) vom 1. Juli 1975 i. d. F. der Änderungen vom 25. Mai 1977 und vom 1. Juli 1980

Vibrionenseuche der Rinder. In: Arbeitsanleitungen zur Labordiagnostik von anzeigepflichtigen Tierseuchen (aktualisierte Fassung, Stand November 2002), S. 223-233, Hrsg. BMVEL

Richtlinie 2003/43/EG des Rates vom 26. Mai 2003 zur Änderung der Richtlinie 88/407/EWG zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Anforderungen an den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Samen von Rindern und dessen Einfuhr. Amtsblatt der Europäischen Union, 11.06.2003, L 143/23-31

8 INSTITUT FÜR MOLEKULARE PATHOGENESE: MYCOBACTERIUM AVIUM SSP. AVIUM UND SSP. HOMINISSUIS – MOLEKULAR-EPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Möbius, P.*, Lentzsch, P.[1], Moser, I. und Köhler, H.

Einleitung

Neben der Tuberkulose stellen Mykobakteriosen, die vor allem durch die Spezies des Mycobacterium-avium-Komplexes (MAC) hervorgerufen werden, die häufigsten Mykobakterien-bedingten Erkrankungen landwirtschaftlicher Nutztiere dar. Auch beim Menschen sind Erreger des MACs die am häufigsten mit Erkrankungen assoziierten nicht tuberkulösen Mykobakterienspezies.

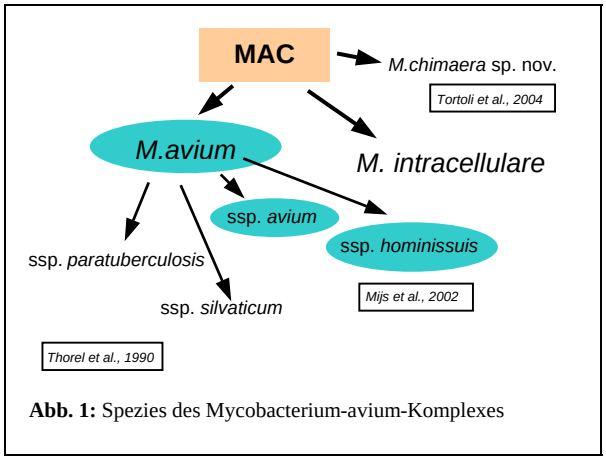


Abb. 1: Spezies des Mycobacterium-avium-Komplexes

Gegenwärtig rechnet man dem MAC zwei eng verwandte Spezies, *Mycobacterium* (*M.*) *avium* und *Mycobacterium intracellulare* und andere noch weniger gut definierte Organismen zu (Abb. 1). Basierend auf Unterschieden in der Pathogenität, dem Wirtsspektrum, sowie phänotypischen und genotypischen Charakteristika, wird die Spezies *M. avium* in *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (Thorel et al., 1990) und *M. avium* ssp. *hominissuis* (Mijs et al., 2002) unterteilt. *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* (das „Ringeltauben"-Mykobakterium) sind vorrangig für Vögel pathogen. *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ruft beim Rind und kleinen Wiederkäuern die Paratuberkulose, eine chronische granulomatöse Enteritis (Johne`sche Krankheit) hervor. Alle vier *M. avium* Subspezies wurden auch aus Darmläsionen und Lymphknoten einer Vielzahl verschiedener anderer Wirte isoliert (Thorel et al., 1997), ihre Rolle als ätiologisches Agens für Erkrankungen ist bisher nicht geklärt. Alle diese Vertreter des MAC weisen eine hohe Tenazität auf und werden weit verbreitet in der belebten und unbelebten Natur gefunden, so in Wasser (Oberflächen- und Leitungswasser), im Boden, in Blumenerde, in Einstreu, im Hausstaub, in Futtermitteln und Ausscheidungen von Tieren (Inderlied et al., 1993)

M. avium* ssp. *avium (Serotypen 1-3) verkörpert den primären Erreger der aviären Tuberkulose bei Nutzgeflügel, Wild- und Ziervögeln. Diese weltweit verbreitete und auch als Geflügeltuberkulose bezeichnete Krankheit verläuft chronisch, ist therapieresistent und manifestiert sich in einer Septikämie. Der Erreger ist nur von Vogel zu Vogel leicht übertragbar, die Tiere infizieren sich durch kontaminiertes Oberflächen- und Trinkwasser, durch mit Kot verschmutztes Futter und aerogen über Ausscheidungen und Staub. Die Infektion verläuft zu 90% oral, tuberkulöse Veränderungen werden vorwiegend in der Leber, aber auch in der Milz und im Darm gefunden (Abb. 2 und 3). Innerhalb von 2-4 Monaten führt der chronisch protrahierte Krankheitsverlauf zum Tod. *M. avium* subsp. *avium* wurde

[1] *Leibniz-Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung, Müncheberg*

auch bei anderen Nutztieren (vorrangig Schwein und Rind) und Wildtieren nachgewiesen, aber nur selten beim Menschen.

Organismen dieser Subspezies sind nur für Vögel obligat pathogen. Durch die Geflügelintensivhaltung spielt die aviäre Tuberkulose in Deutschland heute praktisch keine Rolle mehr. Zwischen 1996 und 2003 betrafen Meldungen fast ausschließlich kleine Bestände in Privathand, jedoch auch wertvolle Vögel in zoologischen Gärten (Martin und Schimmel, 2000; Daten zu den Jahren 2001-2003 in Tabelle 1 und 2).

Tab. 1: Nachweis von Geflügeltuberkulose am Institut für Geflügelkrankheiten der Universität München (S. Johannknecht und R. Kurbel, persönliche Mitteilung)

Vogelart	**2002**	**2003**
Ziervögel I (Heimvögel: Sittiche, Papageien …)	10	6
Ziervögel II (sonstige, v.a. Tauben, Pfaue)	4	1
Beizvögel	3	2
Nutzgeflügel	2	10
Zoovögel – Bayern	38	5
Zoovögel – Baden-Württemberg	-	5
Wildvögel	3	1

Tab. 2: Nachweis von Geflügeltuberkulose am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf (A. Kley, persönliche Mitteilung)

Vogelart	**2001**	**2002**	**2003**
Legehennen	6	9	6
Rassehühner	-	-	3
Fasan	1	1	-
Stieglitz	-	-	1

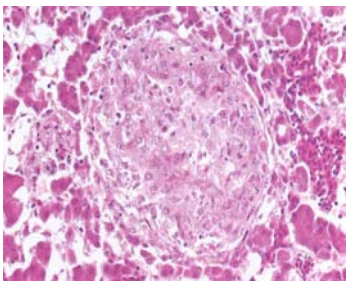


Abb. 2:
Tuberkel
M. avium ssp. *avium*
in der Leber
(Huhn)

Abb. 3:
tuberkulösen Veränderungen
durch *M. avium* ssp. *avium*
in der Milz, Leber und im Darm
(Huhn)

Aus: A Colour Atlas of Diseases & Disorders of the Domestic Fowl & Turkey (C.J. Randall)

Organismen der Subspezies ***M. avium* ssp. *hominissuis*** (Serotypen 4-6, 8-11 und 21) sind nur gering virulent für Vögel, gehören jedoch wie auch *M. avium* subsp. *avium* zu den opportunistischen Erregern für Säugetiere. Eine Infektion bei Säugetieren verläuft meist ohne klinische Symptome, sie bleibt im Wesentlichen auf regionale Lymphknoten des Rachens und des Intestinaltraktes unter Beteiligung von einem oder mehreren Lymphknoten beschränkt (granulomatöse Lymphadenitis). Ein seuchenartiges Auftreten fehlt und es kommt nur in Einzelfällen zu generalisierten Erkrankungen mit disseminierten Läsionen in verschiedenen Organen (Leber, Milz, Niere, Lunge, Peritoneum, ev. Euter; siehe Abb. 4). Eine Infektion erfolgt vorrangig über den Gastrointestinaltrakt, nur selten über die Lunge (Pferde, Hunde) oder über eine lokale Infektion der Haut durch Kontamination mit offenen Wunden (Katzen). *M. avium* wurde u. a. auch bei Hirsch, Esel, Maultier, Dachs, Fuchs, Frettchen, Igel, Känguru, Maus, nicht humanen Primaten und Fischen nachgewiesen.

Epidemiologie, klinische und pathologische Befunde

Neben der Paratuberkulose bei Wiederkäuern sind in Deutschland Mykobakterieninfektionen bei Schweinen, die hauptsächlich durch Vertreter des MAC-Komplexes hervorgerufen werden, von Bedeutung. Es wurden Mastdurchgänge mit sehr hohen Prävalenzraten nachgewiesen (Uhlemann und Mitarb., 1975). Die Mehrheit gehörte der Spezies *M. avium* an (Fischer und Mitarb., 2000). Als Infektionsquellen konnten die Aufnahme infizierten Vogelkotes, kontaminierte Einstreu oder Torf, der an Ferkel als diätetischer Futterzusatz verfüttert wird, nachgewiesen werden. Derartige Infektionen treten im Rahmen tierärztlicher Fleischuntersuchungen in den meisten Fällen als herdförmige granulomatöse Entzündung regionaler Lymphknoten und multipler Veränderungen in der Leber zutage (Abb. 4). Es werden auch ausgebreitete tuberkulöse Veränderungen an mehreren Organen und zugehörigen Lymphknoten festgestellt. Erst bei einer generalisierten Tuberkulose wird der Tierkörper und alle anderen Nebenprodukte der Schlachtung nach geltendem Fleischhygiene-Recht als untauglich beurteilt.

Abb. 4:
Multiple herdförmige Veränderungen in der Leber und den Leberlymphknoten eines Schlachtschweines, verursacht durch *M. avium* ssp. *hominissui*s (G. Martin, Jena, 2001)

M.-avium-Infektionen des Menschen haben in den vergangenen zwei Jahrzehnten für Personen mit geschwächtem Immunsystem, vor allem für HIV-infizierte aber auch Tumor-Patienten, weltweit stark an Bedeutung gewonnen. Bei immunkompetenten Menschen sind Infektionen mit *M. avium* sehr selten und prägen sich als chronische Lungenerkrankungen bei alten Menschen, zervikale Lymphadenitis bei Kindern und Weichteilinfektionen aus, aber selten als disseminierte Erkrankungen. Auf Grund des ubiquitären Vorkommens der Bakterien des Mykobakterium-avium-Komplexes ist es schwierig, gesicherte epidemiologische Zusammenhänge für die Infektionen bei Tier und Mensch nachzuweisen. *M.-avium*-Stämme in Lebensmitteln, die vom Schwein abstammen, werden als mögliche Quelle für Infektionen beim Menschen diskutiert.

Ergebnisse eigener Untersuchungen zur Differenzierung und Molekularen Epidemiologie

Im Folgenden werden Ergebnisse zur Differenzierung und Typisierung von *M.-avium*-ssp.-*avium*- und ssp.-*hominissuis*-Stämmen, isoliert aus verschiedenen Wirtspezies, vorgestellt. Die molekulare Typisierung der *M.-avium*-Isolate diente dem Ziel, epidemiologische Verknüpfungen zwischen *M.-avium*-Stämmen von Nutzvieh und humanen Isolaten zu untersuchen. Es wurden vorrangig Isolate von Schwein, Rind und Mensch aus verschiedenen Regionen Deutschlands verwendet.

Bei den humanen Stämmen handelte es sich um Stämme von Patienten, bei denen Tuberkulose vermutet wurde oder die an schwereren Mykobakteriosen erkrankt waren. Die Schweineisolate stammten aus makroskopisch veränderten Lymphknoten von Schweinen verschiedener Stallherkunft, die Rinderisolate von Tieren ohne makroskopische Veränderungen oder klinische Erkrankungen. Die Anzahl verfügbarer Isolate anderer Wirte war stark eingeschränkt. Die Stämme von Fuchs und Hund kamen von Tieren, bei denen keine pathologischen Veränderungen nachgewiesen werden konnten.

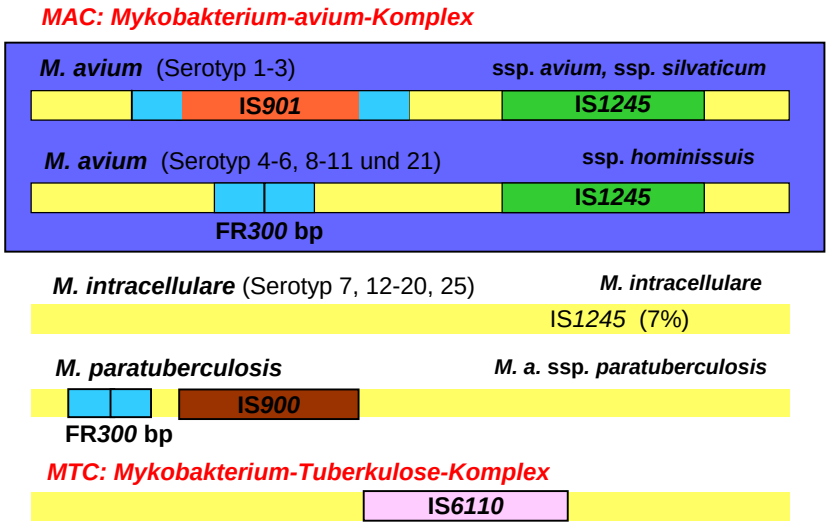


Abb. 5: Speziesspezifische Insertionselemente der Mykobakterien

A) Differenzierung

Die Isolate wurden nach standardisierten Methoden kultiviert (DIN 58943) und mittels Ziehl-Neelsen gefärbt. Alle säurefesten Organismen wurden unter Nutzung des AccuProbe-Tests (Gen-Probe Inc.) und der PCR (Zielsequenz 16S rDNA) als Mykobakterien identifiziert (Böddinghaus und Mitarb., 1990) und mit Hilfe einer Multiplex PCR (Wilton aund Cousins, 1992) und einer PCR-REA (Telenti et al., 1993) in die Spezies *M. intracellulare* und *M. avium* unterschieden.

Zur weiteren Differenzierung dienten Einzel-PCRs zum Nachweis der subspeziesspezifischen Insertionselemente (Abb. 5) IS*1245*, IS*901* für *M. avium* ssp. *avium* bzw. IS*1245* und die „Flanking"-Regionen FR*300* für *M. a.* ssp. *hominissuis* (Kunze et al., 1992; Guerrero et al., 1995; Übersicht bei Möbius und Köhler, 2004).

Tab. 3: Vorkommen von Mykobakterien bei Schweinen

Anzahl der Tiere	Kultur positiv
98*	**40** / 80 (50%)
110**	**90** / 600 (15%)

* Tiere mit, ** Tiere ohne makroskopische Lymphknotenveränderungen

Mycobacterium avium Subspezies konnten beim Schwein sowohl in makroskopisch veränderten, als auch in makroskopisch unveränderten Lymphknoten nachgewiesen werden (Tab. 3). Bei Mensch und Hund wurde kein einziger *M.-avium*-ssp.-*avium*-Stamm gefunden, alle Isolate gehörten zur Subspezies *hominissuis*. Dieses Ergebnis wird mit dem generell niedrigen Vorkommen der aviären Tuberkulose in Europa und den hier vorherrschenden Lebensbedingungen mit sehr geringem Kontakt zu Vögeln in Zusammenhang gebracht. Bei Schwein, Rind und Fuchs gehörten, unabhängig vom Vorkommen pathologischer Veränderungen in den Lymphknoten, jeweils etwa ein Drittel der Isolate zur Subspezies *avium* und etwa zwei Drittel zur Subspezies *hominissuis* (Tab. 4). Eine Übertragung von *M. avium* ssp. *avium* ausgehend von Wildvögeln wird vermutet.

Tab. 4: Vorkommen der Subspezies *avium* und *hominissuis* bei verschiedenen Wirten (Möbius et al., 2004)

Herkunft	Anzahl der Isolate	*M. avium* ssp. *avium*	*M. avium* ssp. *hominissuis*
Mensch	57	-	100 %
Schwein	60	27 %	73 %
Rind	45	35 %	65 %
Fuchs	11	27 %	73 %
Hund	5	-	100 %

B) Molekulare Typisierung von Mycobacterium-avium-Isolaten mit Hilfe von RFLP und Makrorestriktionsanalyse (PFGE)

Die Stämme wurden mit Hilfe der Analyse des Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP) und der Makrorestriktions-Analyse (PFGE) typisiert. Die entstandenen DNA-Fragmentmuster beider Fingerprint-Methoden wurden mit Hilfe der Gelcompar Software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) analysiert und miteinander verglichen. Dendrogramme zur Darstellung der genetischen Ähnlichkeiten wurden erstellt. Mit der Jackknife-Methode (GelCompar II, Applied Maths, Kortrijk, Belgium) wurde die interne Stabilität einzelner Gruppen von Genotypen der gleichen Herkunft, bezogen auf den Wirt, und der gleichen Subspezies berechnet.

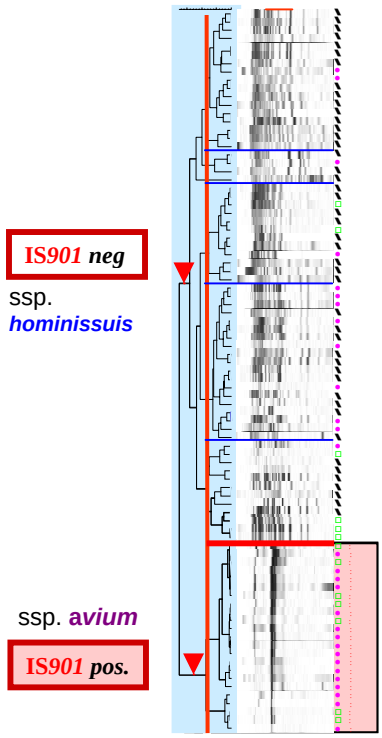
Beim Vergleich aller IS*1245*-RFLP-Muster wurden die Stämme entsprechend ihrer Subspezieszugehörigkeit in zwei große Gruppen aufgeteilt (Abb. 6). Die erste Gruppe enthielt die Isolate der Subspezies *hominissuis* mit sehr vielgestaltigen vielbändigen unterschiedlichen Mustern, bestehend aus 9 bis 26 Banden. Die zweite Gruppe zeigte den „Vogel-Typ", ein

übereinstimmendes 2-3 Banden-Muster, durch den die Subspezies *avium* charakterisiert ist (Guerrero et al., 1995, Ritacco et al., 1998).

Abb. 6: Genetische Ähnlichkeiten von 87 *M.-avium*-Stämmen isoliert aus
Mensch ◣ (n=45)
Schwein ● (n=29)
Rind □ (n=13)

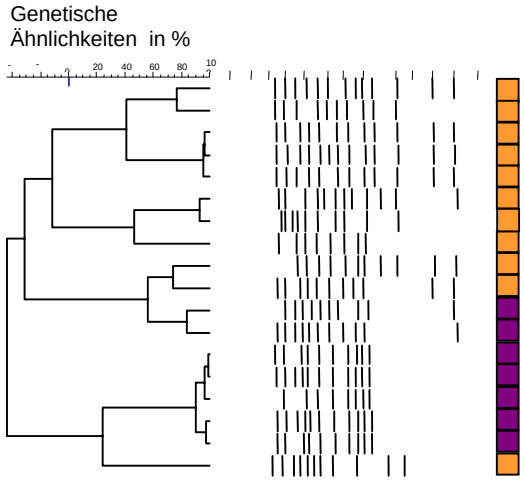
Das Dendrogramm wurde mit dem Algorythmus nach WARD erstellt (Möbius et al., 2003).

: = *M. avium* ssp. *avium*



IS*1245*-RFLP

Die *M.-avium*-ssp.-*avium*-Stämme konnten mit Hilfe der IS*901*-RFLP weiter unterschieden werden. Innerhalb der Subspezies-*hominissuis*-Gruppe verteilten sich die Isolate auf viele verschiedene Subgruppen, wobei sich Muster animaler Isolate auch in Subgruppen mit vorwiegend humanen Isolaten befanden. Die Diversität der humanen Isolate war höher als die der Schweine-und Rinderisolate, was auf die sehr unterschiedliche geographische Herkunft der humanen Wirte zurückgeführt werden kann. Bis auf eine Ausnahme wiesen alle untersuchten humanen Stämme ein individuelles Fingerprintmuster auf. Schweine- und Rinderisolate, die jeweils von Tieren mit gemeinsamer Stallherkunft abstammten, zeigten ein hohes Maß an Ähnlichkeit (Abb. 7).



RFLP IS*1245*

Max. Ähnlichkeiten	Stall 1	Stall 2
Stall 1	**73**	0
Stall 2	26	**100**

Signifikanz der Assoziation der Stämme zur Stallherkunft der Rinder, richtige Identifikation in Prozent (Jackknife-Methode)

Abb. 7: Genetische Ähnlichkeit von *M.-avium*-ssp.-*hominissuis*-Stämmen, isoliert aus Rindern von zwei Ställen (Möbius et al., 2004)

Die im Ergebnis der PFGE entstandenen vielbändigen Fingerprintmuster aller Isolate teilten sich beim Vergleich ebenfalls auf die zwei großen Gruppen der Subspezies auf. Die PFGE-Subgruppen besaßen jedoch nur eine sehr geringe Übereinstimmung mit den Subgruppen im IS*1245*-RFLP Dendrogramm für die ssp. *hominissuis*-Isolate (30-40%) und denen im IS*901*-RFLP Dendrogramm für die ssp. *avium*-Isolate. Das Gleiche galt für Stämme unterschiedlicher Wirtsherkunft mit großer Ähnlichkeit der Fingerprintmuster. Diese Unterschiede sollten zur Relativierung von Rückschlüssen auf epidemiologische Verknüpfungen im Ergebnis von Untersuchungen mit diesen Methoden führen.

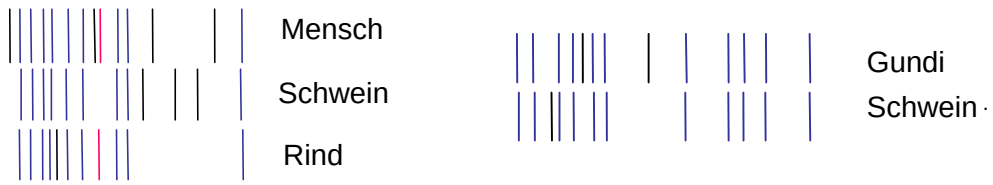


Abb. 8: „Fingerprint"-Muster (IS*1245*-RFLP) von einzelnen *M.-avium*-ssp.-*hominissuis*-Stämmen verschiedener Wirte

Die Dendrogramme beider Methoden zeigen große Ähnlichkeiten zwischen einzelnen *M.-avium*-subsp.-*hominissuis*-Stämmen, die von verschiedenen Wirten stammen: Mensch und Schwein, Mensch und Rind, Rind und Schwein, aber auch Mensch und Hund, Mensch und Fuchs. Dabei handelt es sich aber immer nur um sehr ähnliche, nicht identische Stämme (Abb. 8). Fortführende Untersuchungen mit Isolaten unterschiedlicher Wirtsherkunft, aber gleicher geographischer Herkunft könnten zu genaueren epidemiologischen Aussagen führen.

Genotypische Unterschiede von Isolaten verschiedener Wirte können auf Wirtsadaptationsprozesse hinweisen und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transmission von Infektionen herabsetzen. Die Berechnung von wirtsassoziierten Ähnlichkeiten der „Fingerprint"-Muster (für Mensch, Rind und Schwein) mit Hilfe der Jackknife-Methode führte bei beiden Methoden zu vergleichbaren Ergebnissen. Unter Einbeziehung aller untersuchten Isolate zeigten die Fingerprintmuster der Subspezies-*hominissuis*-Isolate eine wirtsassoziierte Ähnlichkeit zwischen 60 und 70 %. (Tab.5). Für die IS*901*-„Fingerprint"-Muster der Rinder- und Schweine-Isolate der Subspezies *M. a.* ssp. *avium* ergaben sich höhere wirtsassoziierte Ähnlichkeiten von 70 bis 90 %. In weiteren Untersuchungen müssen diese Ergebnisse mit Hilfe einer wesentlich höheren Anzahl von Einzelisolaten untermauert oder widerlegt werden.

Tab. 5: Signifikanz der Wirtsassoziation der „Fingerprint" – Muster aus der IS*1245*-RFLP der Einzelstämme von *M. avium* ssp. *hominissuis* (Möbius et al., 2004)

Maximale Ähnlichkeiten	Mensch (n = 55)	Schwein (n = 41)	Rind (n = 20)
Mensch	66	19	15
Schwein	20	60	15
Rind	14	21	70

korrekte Identifizierung in Prozent (Jackknife-Methode)

Zusammenfassung
In Deutschland findet keine Übertragung von *M. avium* ssp. *avium* Stämmen vom Tier auf den Menschen statt. Unsere Ergebnisse unterstützen die Existenz epidemiologischer Verknüpfungen zwischen *M.-avium-ssp.-hominissuis*-Stämmen landwirtschaftlicher Nutztiere und dem Menschen, sie zeigen, dass beide Populationen möglicherweise gemeinsame Infektionsquellen teilen. Rinder- und Schweineisolate, die große Ähnlichkeiten mit humanen Stämmen besitzen und humane Isolate mit genotypischen Charakteristika von Schweine- und Rinderstämmen können zu einem Pool an Stämmen gehören, die sich in der Umwelt befinden und zwischen der humanen und animalen Population zirkulieren.

Literatur

BÖDDINGHAUS, B., ROGALL, T., FLOHR, T. et al.: Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA (J Clin Microbiol. **28**, 1751-1759, 1990).

FISCHER, S., EHRLER, M., RÜSCH-GERDES, S. und KRÜGER, M.: Stellen Mykobakterien im Schweinefleisch eine Gefahr für den Verbraucher dar? (Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung **7**, 150-154, 2000)

GUERRERO, C., BERNOSCONI, C., BURKI, D., BODMER, T., und TELENTI, A.: A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS*1245*, is a specific target for analysis of strain relatedness (J Clin Microbiol **33**, 304-307, 1995)

INDERLIED, C. B., KEMPER, C.A., und BERMUDEZ, L.M.: The *Mycobacterium avium* Complex (Clin Microbiol Rev **6**, 266-310, 1993)

KUNZE, Z.M., PORTAELS, F., und MCFADDEN, J.J.: Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS*901* (J Clin Microbiol **30**, 2366-2372, 1992)

MARTIN, G., und SCHIMMEL, D.: Die *Mykobakterien avium*-Infektion des Geflügels - (k)eine Gefahr für die menschliche Gesundheit? (Deut Tierärztl Woch **107**, 53-58, 2000)

MIJS, W., DE HAAS, P., ROSSAU, R., VAN DER LAAN, T., RIGOUTS, L., PORTAELS, F., und VAN SOOLINGEN, D.: Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium* (Int J Syst Evol Micr **52**, 1505-1518, 2002)

MÖBIUS, P., MARTIN, G., NAUMANN, L., MOSER, I., KÖHLER, H. und ERLER, W.: Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium*: comparative investigations among isolates from pig, cattle and man in Germany (Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Tartu, Estonia, June 29 – July 02, 2003, Abstract 42)

MÖBIUS, P., LENTZSCH, P., MOSER, I., KÖHLER, H. und NAUMANN, L.: Genotyping of *Mycobacterium avium* isolates from man, livestock, and domestic-, zoo- and wild animals: Indications of host associations and transmissions ways? (Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Alghero, Italy, 27-30 June 2004, Abstract, 60)

MÖBIUS, P. und KÖHLER H.: Mykobakterien des *Mycobacterium-avium*-Komplexes: Differenzierung und Pathogenität für Tiere und den Menschen (FLI-Info **2,** 9-12, 2004)

RITACCO, V., KREMER, K., VAN DER LAAN, T., PIJNENBURG, J.E.M., HAAS, P.E.W., und VAN SOOLINGEN, D.: Use of IS*901* and IS*1245* in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates (Int J Tuberc Lung D **2**, 242-251, 1998)

TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, M., BALLY, F., BÖTTGER, E., und BODMER, T.: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis (J Clin Microbiol **31**, 175-178, 1993)

THOREL, M.F., KRICHEVSKY, M., und LEVY-FREBAULT, V.V.: Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. (Int J Syst Bacteriol **40,** 254-260, 1990)

TORTOLI, E., RINDI, L., GARCIA, M.J., et al.. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. (Int J Syst Evol Microbiol. **54,** 1277-1285, 2004)

UHLEMANN, J., HELD, R., MÜLLER, K. und Mitarb.: Schweinetuberkulose in einem Mastkombinat nach Einstreu von Hobel- und Sägespänen (Mh. Vet. Med. **30,** 175-180, 1975)

WILTON, S. und COUSINS, D.: Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube (PCR Meth Appl **1,** 269-273, 1992)

Weitere zum Thema gehörende Literatur liegt beim Autor vor.

B) LAUFENDE FORSCHUNGSPROJEKTE

1 VIREN

1.1 PICORNAVIREN

1.1.1 Maul- und Klauenseuchevirus (MKSV)

Etablierung und Weiterentwicklung diagnostischer Methoden für die MKS
Haas, B.*, Hoffmann, B., Höhle, C. und Keil, G.

Die One-tube-real-time-PCR für Maul- und Klauenseuchevirus wurde so weiterentwickelt, dass eine Kontamination mit der Positivkontrolle erkannt werden kann. Die konventionelle PCR dient als Bestätigungstest und wurde zur Verringerung der Kontaminationsgefahr modifiziert.
Um ELISAs gegen Nicht-Strukturproteine (NSP) des MKS-Virus zu validieren, wurden Serumproben geimpfter und anschließend infizierter Rinder eingesetzt. Die Hauptaufgabe dieser ELISAs ist es, infizierte Tiere in einer geimpften Population zu erkennen. Mit einer für geimpfte Rinderpopulationen vorerst auf etwa 90 % geschätzten Sensitivität würde sich die NSP-Serologie nach einer Impfung als Herdentest gut eignen; einzelne Virusträger kann sie aber nicht mit Sicherheit aufspüren. Bei nicht geimpften Populationen kann die NSP-Serologie als Ersatz für nicht ausreichend vorhandene typspezifische Tests eingesetzt werden.
Während Screening-ELISAs für NSPs inzwischen zur Verfügung stehen, besteht nach wie vor Bedarf für einen Bestätigungstest, der es erlaubt, nicht negative Resultate dieser ELISAs zu klassifizieren und objektiv auszuwerten. Um einen Profiling-ELISA für Antikörper gegen MKS-NSPs zu etablieren, sollen zunächst MKS-NSPs, welche carboxyterminal mit sechs Histidinen (6xHis-tag) versehen wurden – 2C, 3ABC(C163G), 3A, 3B, 3C(C163G) und 3D – mittels Ni-Agarose-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die MKS-NSPs wurden mit rekombinanten Baculoviren hergestellt, deren Genome in *E. coli* als “bacterial artificial chromosome” (BAC) erzeugt worden waren. Mit Ausnahme des 2C konnten alle ORFs mit den Codons für das 6xHis-tag fusioniert und in das Baculovirus-Genom eingebaut werden. Die Rekombinanten wurden nach Infektion von SF9 Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz identifiziert. Die rekombinante Baculovirus DNA wurde aus *E. coli* isoliert und zur Transfektion von Insektenzellen verwendet. Zur Valdierung von NSP-Tests wurde ein Panel von mehr als hundert Rinderseren aus Impfstoffprüfungen und anderen Infektionsversuchen etabliert.

Inaktivierung von MKSV in Därmen
Haas, B.*

Es wurde untersucht, ob eine Phosphatsalzmischung, die nachweislich das CSFV in zur Verwendung als Wursthülle vorgesehenen Därmen inaktiviert, auch zur Inaktivierung des MKSV geeignet ist. Die Fragestellung ist deswegen von Bedeutung, weil ein großer Teil des europäischen Bedarfs an Naturdärmen durch Importe aus endemisch MKS-infizierten Ländern gedeckt wird und die zurzeit vorgeschriebenen Verfahren das MKSV nicht zuverlässig inaktivieren. Schweine und Schafe wurden mit den MKS-Stämmen O_1Kaufbeuren und AIran2/97 infiziert. Die meisten Schweine zeigten typische MKS-Symptome, während bei den Schafen erwartungsgemäß in der Regel nur Fieber festzustellen war. Die Därme wurden gewaschen und die Schleimhaut nach den üblichen Verfahren entfernt. Die Darmproben wurden

aufgeteilt und je ein Aliquot einem der vier untersuchten Verfahren unterzogen - NaCl bei RT und 4 °C, Phosphatsalz bei RT und 4 °C. In beiden Spezies waren die Virustiter in Därmen gering. Dies kann zwar als Hinweis interpretiert werden, dass das Einschleppungsrisiko über diesen Pfad geringer ist als zunächst befürchtet, stellt aber für die Studie ein experimentelles Problem dar, weil so keine Inaktivierungskinetik über mehrere Zehnerpotenzen erstellt werden kann. Jedoch wurde bereits deutlich, dass bei 4 °C mit keinem der beiden Salze eine verlässliche Inaktivierung auftritt. Nach 30 Tagen bei Raumtemperatur war keine Infektiosität mehr festzustellen, jedoch ist die „Sicherheitsspanne“ möglicherweise zu gering. Weitere Versuche sind notwendig, um Material zu generieren, mit dem die Inaktivierungskinetik über mehrere Zehnerpotenzen getestet werden kann. Daher ist geplant, Versuchstiere intravenös mit hochtitrigem Zellkulturvirus zu infizieren und dann zu schlachten.

1.2 CALICIVIREN

1.2.1 Virus der Hämorrhagischen Kaninchenkrankheit (RHDV), des European Brown Hare Syndroms (EBHSV) und Felines Calicivirus (FCV)

Untersuchungen zur Genexpressionsstrategie von Caliciviren
Luttermann, C. und Meyers, G.*

Unter dem Namen *Caliciviridae* werden eine Reihe von nicht-umhüllten Viren mit charakteristischer Morphologie und einzelsträngigem RNA-Genom positiver Polarität zusammengefasst. Neben Erregern, die für die Auslösung von Gastroenteritiden beim Menschen verantwortlich sind, gehören auch eine Reihe tierpathogener Viren zu den Caliciviren. Das Genom der Caliciviren enthält zwei oder drei offene Leserahmen (ORF), wobei der ORF#1 die Gene für sämtliche Nichtstrukturproteine umfasst und in ein hypothetisches Polyprotein translatiert wird, das proteolytisch in die reifen Virusproteine zerlegt wird. Nahe am 3’ Ende des Genoms befindet sich ein ORF, der für ein Kapsidprotein kodiert (VP10 beim RHDV). In infizierten Zellen findet man zusätzlich zum Genom eine prominente subgenomische RNA, die beim RHDV ca. 2,4 Kilobasen lang ist und die Gene für das Hauptkapsidprotein und das VP10 in zwei getrennten, überlappenden ORFs enthält. Diese RNA ist zumindest die Hauptquelle der beiden Strukturproteine, wobei das VP10 mittels eines bisher nicht beschriebenen Translationsterminations-/Reinitiationsmechanismus exprimiert wird. Im Gegensatz zu bisher beschriebenen Fällen, die diesem Prinzip folgen, konnte gezeigt werden, dass eine der Stop-/Start-Region vorgelagerte Sequenz für die Expression essenziell ist. Verkürzungsexperimente zeigten, dass die minimale Länge dieses von uns als ‚termination upstream ribosomal binding site’ (TURBS) bezeichneten Sequenzelementes inklusive der Stop-/Start-Region 84 Nukleotide umfasst. Interessanterweise führen interne Deletionen in der TURBS nicht notwendigerweise zum Verlust der Aktivität, so dass davon auszugehen ist, dass nicht die gesamte Sequenz, sondern nur einige Abschnitte für die Translationsinitiation wichtig sind. Mit weiteren Deletions- und Punktmutationen werden die relevanten Sequenzmotive zur Zeit identifiziert.
Auch beim felinen Calicivirus (FCV) befindet sich am 3’ Ende des Genoms bzw. der subgenomischen mRNA ein Leserahmen, der für das Kapsidprotein kodiert. Die Organisation der subgenomischen mRNA entspricht mit zwei getrennten überlappenden Leserahmen im Wesentlichen der der RHDV mRNA. Um zu überprüfen, ob auch beim FCV eine TURBS die Expression dieses Proteins steuert, wurde ein Expressionskonstrukt hergestellt, von dem eine der mRNA äquivalente RNA transkribiert werden kann. In Expressionsstudien zeigte sich, dass ausgehend von dieser RNA das dem VP10 entsprechende FCV Protein erhalten werden kann.

Mittels Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass wiederum eine Sequenz von ca. 100 Nukleotiden stromauf von der Stop-/Startstelle essenziell für die Translation des 3' terminalen ORFs ist, also wie beim RHDV eine TURBS vorhanden ist. Damit ist nahe liegend, dass bei allen Caliciviren die Translation des Kapsidproteins von einer TURBS gesteuert wird, und es stellt sich die Frage, warum die Viren diesen ungewöhnlichen Mechanismus verwenden. Dieser Frage soll in weiteren Arbeiten zum FCV nachgegangen werden, da für das FCV ein Gewebekultursystem und ein infektiöser cDNA-Klon zur Verfügung stehen.

Etablierung einer Real-time-RT-PCR zum Nachweis des RHDV
Gall, A., Hoffmann B. und Schirrmeier, H. *

Für Studien zur Replikation des RHDV und zu Pathogenesemechanismen der Erkrankung wurde eine hochsensitive Real-time-RT-PCR, die ein 104 bp Genprodukt aus der für das Kapsidprotein codierenden Region amplifiziert, als TaqMan®-PCR entwickelt. Kommerziell erhältliche one-step-PCR-Kits wurden vergleichend für die Eignung im System getestet und Optimierungen des Tests bezüglich Mg-Ionen, Sondenkonzentrationen und Temperaturprofil vorgenommen. Fünfzehn verschiedene RHDV-Isolate aus den Jahren 1990 bis 2004 konnten detektiert werden; die Sensitivität lag im Vergleich zu einer konventionellen RT-PCR um fünf log-Stufen höher. Für eine absolute Quantifizierung von unbekannten RNA-Mengen wurde eine *in-vitro*-transkribierte RNA hergestellt und als externer Standard eingesetzt. Die mit diesem Standard ermittelte analytische Sensitivität des Tests lag unter zehn Kopien/Reaktion; die diagnostische Sensitivität bei der Untersuchung von Feldproben lag bei einer Kopie/Reaktion. Um die Effizienz der RNA-Extraktion und der RT-PCR für jede Probe überprüfen zu können, wurde ein Duplex Test etabliert. Hierbei wurde ein *In-vitro*-Transkript eines partiellen EGFP-Gens als heterologe interne Kontrolle während der RNA-Extraktion zugegeben. Anschließend wurde dieses während der Duplex-Real-time-RT-PCR mittels eigener Primer und TaqMan-Sonde koamplifiziert und detektiert. Anhand einer RNA-Verdünnungsreihe wurde zwischen beiden Testsystemen eine identische Sensitivität gezeigt.

Nachweis viraler RNA nach RHD-Rekonvaleszenz
Gall, A., Hoffmann, B. Teifke, J. und Schirrmeier, H.*
(in Zusammenarbeit mit der Riemser Arzneimittel AG)

RHDV verursacht eine hohe Mortalität bei adulten, seronegativen Kaninchen. Die Rolle überlebender Tiere in der Epidemiologie der Erkrankung ist ebenso unklar wie diejenige von jungen, zwar immunkompetenten, aber nicht empfänglichen Tieren. In einer ersten Studie wurden Kaninchen, die eine experimentelle Infektion mit RHDV überlebten, mittels einer Real-time-RT-PCR untersucht. Virale RNA wurde bis mindestens 15 Wochen nach Infektion in Organen und Exkreten in z. T. hoher Konzentration nachgewiesen. Untersuchungen im Antigen-ELISA ergaben negative bzw. grenzwertige Resultate. Pathologisch-anatomisch und histopathologisch fanden sich keine für RHD spezifischen Läsionen und durch Immunhistochemie konnte RHDV-Antigen in der Leber nicht nachgewiesen werden. Seronegative Kontakttiere entwickelten keine Antikörper und waren auch in der Real-time-PCR negativ. Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte erstmals der Nachweis einer Persistenz von RHDV-RNA in Kaninchen in einer experimentellen Studie erbracht werden.

Expression von VP60 in transgenen Pflanzen und Immunisierungsstudien
Hammer, M., Keil, G., König, P. und Schirrmeier, H.*
(in Zusammenarbeit mit der AG Agrobiotechnologie der Universität Rostock)

Nachdem Ergebnisse der Vorjahre gezeigt hatten, dass die Verwendung künstlicher Leserahmen unter Verwendung pflanzlicher Kodonpräferenzen zu einer deutlich stärkeren VP60 Expression in transgenen Pflanzen führt, wurden weitere Konstrukte und Pflanzen generiert, die insbesondere durch Fusion mit Choleratoxin B (ctxB) auf eine Steigerung der Immunität nach oraler Applikation zielten. Dazu 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). Im Antigen-ELISA getestete Tabak- und Kartoffelpflanzen wiesen keine Steigerung der Syntheseleistung gegenüber früheren Konstrukten auf. Im Western Blot konnte das Fusionsprotein im Unterschied zu pS_VP60SEKDEL nicht detektiert werden. Insgesamt gab es keine eindeutige Überlegenheit eines einzelnen Konstruktes. Die parenterale Applikation transgenen Pflanzenmaterials führte in keinem Fall zur Antikörperbildung im Serum von Mäusen und Kaninchen. Ebenso konnten nach oraler Verabreichung transgener VP60-exprimierender Kartoffelknollen an Kaninchen weder Antikörperbildung noch Schutz vor RHDV-Belastungsinfektion festgestellt werden.
Um die Funktionalität der Leserahmen zu überprüfen, wurden alle synthetischen (Pflanzen-angepassten) VP60-cDNA-Leserahmen in einem eukaryotischen Zellsystem (CRFK-Zellen) transient exprimiert und die Genprodukte analysiert. Das Expressionsniveau von VP60 bzw. von ctxB-VP60 im Antigen-ELISA war mit dem transgener Pflanzen vergleichbar, im Western Blot konnten VP60/ctxB-VP60-spezifische Banden detektiert werden. Zell-Lysate wurden für Immunogenitätsstudien an Mäusen eingesetzt. Bereits durch eine einmalige Injektion konnten VP60-Antikörper induziert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Unterschiede gegenüber dem Einsatz von transgenem Pflanzenmaterial nicht ausschließlich quantitativer Natur sind.

RHDV-Replikation in Zellkulturen
Gall, A., Wege, H., Riebe, R. Köllner, B. und Schirrmeier, H.*

Durch Transfektion von Knochenmarkzellen und peripheren Blutzellen vom Kaninchen mit RHDV-RNA wurde zellkulturgeneriertes Virus hergestellt und als definiertes Material für Studien zur Empfänglichkeit von Primärkulturen und Zelllinien eingesetzt. Konzentriertes zellkulturgeneriertes RHDV erwies sich als infektiös für verschiedene Zellkulturen, allerdings in geringerem Maße als Filtrate von Lebersuspensionen infizierter Kaninchen. Zwanzig Zelllinien (div. Kaninchenzelllinien, Rattenhepatom, Thymuszelllinien verschiedener Tierarten) und fünf primäre Kaninchenzelllinien wurden nach Inokulation mit Lebersuspension mittels indirektem Immunfluoreszenztest, Hämagglutinationstest und Antigen-ELISA auf eine Permissivität gegenüber RHDV getestet. Mehrere Zellen, die auf das Kaninchen zurückgehen, erwiesen sich als infizierbar. Bisher gelang es jedoch nicht, das Virus zu passagieren, und es fand nur im geringen Umfang eine Freisetzung in den Zellkulturüberstand statt. Weiterhin wurden Zellen aus verschiedenen Kaninchenorganen isoliert, kultiviert und für Infektions-versuche verwendet. Dabei erwiesen sich z. B. bis zu 80 % der Zellen in Kulturen aus dem Thymus, dem großen Netz und einer bronchoalveolären Lavage als positiv im indirekten Immunfluoreszenztest.

RHD - ein Modell für das „Fulminant Liver Failure“ Syndrom des Menschen – Eine Studie zur Immunpathogenese der RHD

Hessmann, M., Gall, A.,Wege, H. Schirrmeier, H. und Köllner, B.*

RHD ist eine hoch kontagiöse, akut verlaufende Erkrankung adulter Haus- und Wildkaninchen, die mit Hepatitiden, nekrotischer Degeneration der Hepatozyten und einer disseminierten intravasalen Koagulopathie einhergeht. Die Beteiligung des Immunsystems sollte, ausgehend von einer häufig beobachteten Leukozyteninfiltration der Leber und dem Nachweis von RHDV in periportalen Makrophagen untersucht werden.
Dazu wurden drei Versuchsgruppen gebildet:

- die Infektionsgruppe, die anhand der beobachteten unterschiedlichen Krankheits-verläufe nach oronasaler Infektion in zwei Teilgruppen gegliedert wurde: Gruppe 1, Tiere mit akutem, und Gruppe 2, Tiere mit einem protrahierten Erkrankungsverlauf.
- die Antigengruppe, bei der die Reaktionen des Immunsystems auf inaktiviertes Virus gemessen wurde, und
- die PBS-Gruppe als Behandlungskontrolle, mit der die Auswirkungen der häufigen Blutentnahmen auf die gemessenen Parameter gezeigt werden sollten.

Alle 12 Stunden wurden den Tieren Blut entnommen und verschiedene Parameter gemessen.
Differenzialblutbild: In den infizierten Tieren mit Erkrankungsverlauf zeigte sich eine starke Verschiebung von einem lymphozytären (> 80 % Lymphozyten) zu einem granulozytären (> 90 % neutrophile Granulozyten) Blutbild. Nach einer anfänglichen Proliferation der Lymphozyten 12 - 36 Stunden p.i. wurde eine zunehmend stärkere Lymphopenie gemessen. In allen anderen Gruppen zeigte sich nur eine schwache Leukozytenproliferation.
Analyse ausgewählter CD-Marker: In infizierten Tieren (Gr. 1) wurde 12 - 36 Stunden p.i. eine CD4/CD8 doppelt positive Lymphozytenpopulation gefunden. Einem starken Anstieg der CD8 positiven T-Zellen folgte ein nahezu kompletter Verlust dieser Zellen in moribunden Tieren. Die Aktivierungsmarker CD11, CD14, MHC II waren in allen infizierten und in den immunisierten Tieren leicht erhöht. In der PBS-Kontrollgruppe wurden keinerlei signifikante Veränderungen des CD-Markerprofils gefunden.
Untersuchung des Zytokinprofils: In allen moribunden Tieren wurde ein Th-2 Zytokinprofil (erhöhte IL-4 Expression), in den überlebenden Tieren ein Th1-Zytokinprofil (erhöhte IFNγ-Expression) gemessen. Die immunisierten und die PBS-Kontrolltiere zeigten keine signifikanten Veränderungen.
Schlussfolgerungen: (1) CD8+ Lymphozyten sind in die Pathogenese der RHD einbezogen. (2) die Immunantwort nach Infektion (Th1 oder Th2) spielt eine entscheidende Rolle für die Krankheitsprognose. (3) Die RHD könnte eine Modell für das „Fulminant Liver Failure“ Syndrom des Menschen sein, wie Tunon et. al. (2003) auch aus klinischen, biochemischen und histologischen Daten folgerten.

Diagnose von RHD und EBHS - ein Update

Schirrmeier, H.*, Granzow, H., Dauber, M. und Than Hoa, L.

Seit dem Erstnachweis eines neuen RHDV-Subtyps im Jahre 1996 in Deutschland (Subtyp 2 „Triptis-like“, entspricht RHDVa in der Nomenklatur des OIE-Referenzlabors, Brescia) wurden alle an das FLI eingesandten positiven RHD-Proben mit monoklonalen Antikörpern (mAk) charakterisiert. Dabei wurde bis zum Jahre 2003 ein Anstieg des Anteils von RHDVa am Gesamtuntersuchungsmaterial festgestellt. Ähnliches war bei untersuchten Virusproben aus Österreich zu verzeichnen. Die Untersuchungsergebnisse des Jahres 2004 zeigen jedoch, dass beide Subtypen nach wie vor in der Population zirkulieren und Verdrängungen, wie sie z. B. in Italien festgestellt wurden, nicht zu verzeichnen sind. Erstmals wurden zwei RHDV-Isolate

nachgewiesen, die keinem der bisherigen Subtypen zuzuordnen waren, was möglicherweise auf weitere antigene Veränderungen hinweist. Nicht hämagglutinierende Virusstämme kommen gelegentlich vor, ihr Anteil ist jedoch unverändert gering. Im Jahre 2004 war in Teilen Ost- und Süddeutschlands seit Jahresmitte ein deutlicher Anstieg von EBHS-Fällen zu verzeichnen. Mitgeteilte Beobachtungen über eine Vergesellschaftung von RHD und EBHS konnten wir nicht bestätigen. Ca. 60 % der eingesandten Proben waren insofern für die Routine problematisch, als sie im Hämagglutinationstest negativ waren und nur im ELISA bzw. elektronenmikroskopisch diagnostiziert werden konnten. Erstmals konnten wir auch zwei Fälle verzeichnen, die mit den für die Diagnostik eingesetzten mAk nicht reagierten, was ein Hinweis auf mögliche Veränderungen auch des EBHSV ist. Wir haben deshalb mit der Herstellung weiterer mAk begonnen. Für ein serologisches Screening auf EBHSV wurden ein ELISA und ein indirekter Immunfluoreszenztest unter Verwendung von Bakulovirus-exprimiertem Kapsidprotein etabliert. Insgesamt konnten wir bei 68,8 % (ELISA) bzw. 61,5 % (ind. IFT) von insgesamt 1.352 Hasenseren Antikörper nachweisen. Ein serologisches Screening der Feldhasenpopulation ist insofern von Interesse, als Beziehungen zwischen Populationsdynamik und zyklischem Auftreten von EBHS aufgezeigt werden können.

1.2.2 Norovirus-Infektion des Rindes

Untersuchungen zur Norovirusinfektion des Rindes
Elschner, M., Eppler, P., Otto, P.* und Prudlo, J.

Noroviren lassen sich nicht in Zellkulturen anzüchten. Deshalb wurden zur Vermehrung des Jenavirus (JV) drei kolostrumfreie Kälber im Alter von drei bis fünf Stunden oral mit virushaltiger Kotpräparation (Inokulum) infiziert, um virushaltiges Material für zukünftige Untersuchungen zu gewinnen. Der für das Inokulum verwendete Kot war elf bis vierzehn Jahre bei -20 °C aufbewahrt worden. Alle drei infizierten Tiere erkrankten 15, 16 bzw. 22 h post infectionem an Durchfall. JV wurde mittels Elektronenmikroskopie, Enzymimmunoassay (EIA) und RT-PCR bereits zu Beginn der Erkrankung im Kot nachgewiesen. Andere Durchfallerreger wie Bakterien, Viren oder Parasiten konnten zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden. Die Dauer der Ausscheidung von Jenavirus wurde mit acht bis vierzehn Stunden im EIA und drei bis mindestens sieben Tagen in der RT-PCR ermittelt.

1.3 CORONAVIREN

1.3.1 Porzine Coronaviren

Untersuchungen zu Tropismus und Virulenz unterschiedlicher rekombinanter porziner Coronaviren (r-TGEV)
Saenger, K., von Felbert, I., Granzow, H. 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]; Bruschke, C.J.M. [ID-Lelystad, Niederlande]; Barnett, P. [IAH, Pirbright Laboratory, UK] und McCullough, K. [IVI, Mittelhäusern, Schweiz])

Zielstellung dieser in ein laufendes EU-Projekt (QLK2-CT-2002-00825, „Novel coronavirus vector-based vaccine for prevention of foot-and-mouth disease“) eingebetteten Untersuchungen ist die *In-vivo*-Charakterisierung verschiedener neu etablierter rekombinanter porziner Coronaviren. Ausgehend von dem attenuierten Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV)-

Impfstamm PUR46-MAD, der im Schwein einen enteralen und respiratorischen Tropismus zeigt, rufen aus BAC-TGEV generierte Viren bei neonatalen (1-3 Tage alten), kolostrumfrei aufgezogenen Ferkeln Diarrhöe und Pneumonie hervor. Im letzten Jahr wurden neu etablierte rekombinante Viren (r-TGEV), die verschiedene Restriktionsendonuklease-Spaltstellen aufweisen oder zusätzlich eine Deletion im Gen 7 haben, nach Infektion von drei und vierzehn Tage alten Ferkeln (serologisch TGEV negativ/PRCV positiv) auf Tropismus und Virulenz getestet. Die klinische, pathologisch-anatomische und histopathologische Untersuchung ergab einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf bei den jüngeren Ferkeln, der auch mit einer höheren Replikationsrate der jeweiligen r-TGEV im Darm einherging (3 Tage alte Ferkel: 48 h p.i.: Ø 6,68 x 10^5 PFU/ml, 72 h p.i.: Ø 7,63 x 10^5 PFU/ml; 14 Tage alte Ferkel: 48 h p.i.: Ø 1,19 x 10^4 PFU/ml, 72 h p.i.: Ø 6,03 x 10^5 PFU/ml). Etwa drei Wochen p.i. kam es bei allen älteren Ferkeln zur Rekonvaleszenz und Serokonversion (TGEV positiv/PRCV positiv). Interessanterweise zeigte das r-TGEV mit Restriktionsendonuklease-Spaltstellen und einer Deletion des Gen 7 eine reduzierte Replikation im Lungengewebe. Die Ultrastruktur r-TGEV-infizierter Enterozyten ließ gegenüber nicht-infizierten Enterozyten anfänglich nur geringgradige Veränderungen erkennen. Mikrovillisaum, Terminalgespinst und rER erschienen weitgehend unverändert. Replikation des r-TGEV führte zu geringgradiger Dilatation des Golgi-Apparates. Durch Nachweis von Zytokeratin 18 und Anwendung von Doppelmarkierungstechniken wird der Frage nachgegangen, ob M-Zellen bei der Infektion des Darmepithels eine besondere Rolle zukommt.

1.4 FLAVIVIREN

1.4.1 Virus der Klassischen Schweinepest (CSFV)

Herstellung und Analyse von CSFV-Mutanten
Meyers, G. *, Ege, A. und Saalmüller, A.

Pestiviren verfügen als einzige Vertreter der Familie *Flaviviridae* über drei Strukturglykoproteine, die als E^{rns}, E1 und E2 bezeichnet werden. Ein Vergleich biochemischer und funktioneller Eigenschaften der Polypeptide mit denen der Membranproteine E1 und E2 des nahe verwandten humanen Hepatitis C Virus (HCV) zeigt, dass sich die E1 und E2 Proteine entsprechen, während ein Pendant für das E^{rns} Protein beim HCV fehlt. Das E^{rns} stellt ein essenzielles Strukturprotein des Virus dar, das offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Infektion von Zellen spielt. Ungewöhnlicherweise besitzt das Protein RNase-Aktivität und wir konnten zeigen, dass die Inaktivierung dieser enzymatischen Aktivität die Vermehrung von CSFV in Gewebekultur nicht beeinträchtigt, aber nach Infektion von Schweinen aufgrund eines bisher unbekannten Mechanismus zu einer erheblichen Senkung der Virulenz führt.
Alle bisher im Tier getesteten E^{rns}-Mutanten wiesen Veränderungen auf, die direkt die enzymatisch aktiven Aminosäuren der RNase betrafen. Diese Mutanten erwiesen sich alle als stabil in Gewebekulturexperimenten und im natürliche Wirt, obwohl in manchen Fällen ein einziger Basenaustausch zur Reversion hätte führen können. Damit ist offensichtlich, dass die RNase-Funktion keinen signifikanten Vorteil für die Virusvermehrung darstellt. Untersuchungen mit einer neuen RNase-negativen Mutante, die keine Veränderung der enzymatisch aktiven Reste, sondern einen Austausch im das aktive Zentrum flankierenden Bereich aufwies, zeigten, dass im infizierten Tier eine sehr schnelle Reversion zur Wildtypsequenz erfolgte, obwohl die Mutante in Gewebekulturexperimenten stabil war. Tests mit verschiedenen Zelllinien konnten den Befund als zellspezifisches Ereignis erklären, denn die Reversion trat auch in bestimmten Gewebekulturzellen auf. Bemerkenswert an der

fraglichen Mutante war jedoch, dass die infizierten Tiere trotz der sehr schnellen Reversion keine nennenswerten Krankheitssymptome zeigten. Damit ist gezeigt, dass die RNase als Virulenzfaktor offensichtlich früh nach Infektion eine Rolle spielt und zu späteren Zeitpunkten keine große Relevanz mehr besitzt. Dieses Ergebnis wird helfen, den Wirkmechanismus der RNase weiter aufzuklären.

Entwicklung einer modifizierten attenuierten CSF-Lebendvakzine mit Marker-eigenschaften zur oralen Immunisierung von Wildschweinen
König, P.*, Lange, E., Kaden V. und Beer, M.

Im infektiösen Klon des zytopathogenen Bovinen Virusdiarrhöe Virus (BVDV)-Stammes CP7 wurde durch Austausch der für das Hüllprotein und Hauptimmunogen E2 kodierenden Genabschnitte die Expression von CSFV Alfort187-spezifischen Sequenzen ermöglicht. Nachdem in einem ersten Tierversuch gezeigt wurde, dass die Chimäre CP7_E2alf Läuferschweine nach intramuskulärer Inokulation vor einer letalen CSFV-Belastungsinfektion schützen konnte, wurde in einem weiteren Tierversuch das schützende Potenzial nach oraler Immunisierung von Wildschweinen untersucht. CP7_E2alf erwies sich als unschädlich, weder Fieber noch Leukopenie wurden beobachtet. Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion waren bei allen Tieren neutralisierende Antikörper gegen CSFV (> 200 ND_{50}) nachweisbar. Die Bildung CSFV-E2 spezifischer Antikörper wurden im ELISA Test (IDEXX) verifiziert, während die Tiere im Marker-ELISA (Ceditest CSFV-E^{rns}, *Cedi Diagnostics*) negativ reagierten. Die Wildschweine waren eindeutig als Marker-geimpft identifizierbar. Nach einer letalen CSFV-Belastungsinfektion zeigten sich die Impflinge vollständig geschützt. Es traten weder Krankheitssymptome auf noch war Wildtyp-Virus-Replikation nachweisbar. Alle ungeimpften Tiere aus der Kontrollgruppe starben oder wurden moribund getötet. Innerhalb von drei Wochen nach der Belastungsinfektion serokonvertierten die vakzinierten Tiere im CSFV-E^{rns}-ELISA und konnten als CSFV-infiziert erkannt werden.
Weiterhin wurden die Markerqualitäten von CP7_E2alf nach wiederholter Immunisierung überprüft. Läuferschweine wurden dreimal im Abstand von drei Wochen oral oder intramuskulär geimpft. Sämtliche Tiere serokonvertierten im Schweinepest E2-ELISA, während der Nachweis von CSFV-E^{rns}-spezifischen Antikörpern über den gesamten Beobachtungszeitraum eindeutig negativ blieb.

Nachweis einer konventionellen sowie einer modifizierten attenuierten CSF-Lebendvakzine in Blut und Organproben geimpfter Läuferschweine
König, P., Depner, K.*, Hoffmann, B., Teifke, J. und Beer, M.

In umfangreichen Untersuchungen zu Organverteilung und Virusreplikation wurden Läuferschweine intramuskulär mit CSFV „C“-Stamm oder mit CP7_E2alf immunisiert. Zu keinem Zeitpunkt konnte Virusausscheidung in Nasen- und Speicheltupfern nachgewiesen werden. Sämtliche Kontakttiere blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum im CSFV-Antikörpernachweis seronegativ. CSFV „C“-Stamm wurde bei fünf Tieren am vierten Tag und bei zwei Tieren am fünften Tag nach der Immunisierung aus Blutleukozyten isoliert. Bei drei von acht CP7_E2alf-Impflingen war die Virusanzucht am dritten bzw. fünften Tag erfolgreich. RT-PCR-Untersuchungen fielen bei jeweils zwei Tieren positiv aus, wobei lediglich geringe Kopienzahlen (1 - 27 Kopien/PCR-Ansatz) festgestellt wurden. Im CSFV-Antigen-ELISA reagierte keine der Serumproben positiv. Im Abstand von zwei Tagen wurde jeweils ein Tier pro Gruppe getötet und Organ- und Gewebeproben sowie Lymphknoten und Knochenmark wurden entnommen. Virusanzucht war vier bis acht Tage nach der Impfung aus Tonsillen oder

Parotis möglich. Genomnachweis aus Lymphknoten, Milz und Speicheldrüsen mittels quantitativer RT-PCR war bis überwiegend acht Tage nach der Inokulation positiv. In den Tonsillen aller Tiere konnte über 16 Tage virale RNA nachgewiesen werden. Nach intramuskulärer Applikation der Impfviren CSFV „C"- Stamm oder CP7_E2alf kam es lediglich zu einer kurzen Virämiephase, in der keine Ausscheidung im Nasensekret und Speichel nachgewiesen werden konnte. Der Genomnachweis mittels RT-PCR aus Tonsillenmaterial war mehr als 16 Tage nach der Immunisierung möglich. Diese Ergebnisse unterstreichen die Sicherheit eines möglichen Einsatzes von CP7_E2alf als Impfvirus.

Zur Effektivität des modifizierten Immunisierungsverfahrens im Feld

Kaden, V.* und Lange, E. (in Zusammenarbeit mit Blicke, J., Straubinger, B., Jonas, D. [Rheinland-Pfalz]; Meier-Winn, H. [Saarland]; Jäger, F., Blankenhorn, A. [Nordrhein-Westfalen]; Besch, A. [Luxembourg] und Lange, B. [Riemser Arzneimittel AG])

Das in Baden-Württemberg von 1999 bis 2001 angewandte modifizierte Immunisierungsverfahren, welches eine dreimalige Doppelimmunisierung im Jahr zum Inhalt hat, hat sich auch im Rahmen der CSF-Bekämpfung beim Schwarzwild im Saarland, in Nordrhein-Westfalen sowie in Luxemburg und in Rheinland-Pfalz bewährt. Nach Implementierung der Immunisierung wurde ein rascher Abfall der Virusprävalenz und ein signifikanter Anstieg der Seroprävalenz festgestellt. In allen Impfgebieten, in denen das optimierte Immunisierungsverfahren angewandt wurde, wurden Seroprävalenzraten zwischen 50 und 60 % erreicht, bezogen auf gestreckte Wildschweine. Von Vorteil erwies sich dieses Verfahren vor allem bzgl. der Immunisierung von Frischlingen, wobei die Seroprävalenzraten in den meisten Gebieten bei 40-50 % lagen. In den Bundesländern Saarland und Nordrhein-Westfalen wie auch in Luxemburg konnte in relativ kurzer Zeit nach Einführung der oralen Immunisierung die Seuche getilgt werden. Beide Bundesländer gelten inzwischen als frei von CSF. Selbst in dem endemisch verseuchten Gebiet „Eifel-Hunsrück" zeichnete sich kurzfristig ein Bekämpfungserfolg ab (dreizehn Monate nach Beginn der Impfmaßnahmen letzter Virusnachweis: März 2003). Die für die Tierseuchenbekämpfung zuständigen Behörden wurden von uns bei der Bekämpfung der CSF des Schwarzwildes beraten und unterstützt.

Persistenz von CSFV Stamm „C" nach oraler Immunisierung von Haus- und Wildschweinen

Kaden, V.*, Lange, E. und Riebe, R.
(in Zusammenarbeit mit Lange, B. und Steyer, H. [Riemser Arzneimittel AG])

Im Rahmen der Arbeiten zur oralen Immunisierung des Schwarzwildes gegen CSF war wichtig zu klären, wie lange das Vakzinevirus im immunisierten Tier verbleibt. Zu diesem Zwecke wurden Absatzferkel bzw. Überläufer mittels Spritze oral immunisiert. Bei den im Zeitraum von zwei bis zwölf Tagen nach Vakzinierung beprobten Tieren konnte CSFV weder im Nasensekret noch im Kot nachgewiesen werden. Auch im Blut wurde es nicht gefunden. Im Gegensatz dazu war der Vakzinestamm in Organen von Hausschweinen bis zum achten Tag nach Vakzinierung, bei Wildschweinen bis zum neunten Tag nach Vakzinierung feststellbar. Während das Virus bei Hausschweinen in den Tonsillen, der Milz oder den Mandibularlymphknoten detektiert wurde, war es bei Wildschweinen nur in den Tonsillen nachweisbar.

Entwicklung maternaler Antikörper nach oraler Immunisierung von Frischlings- und Überläuferbachen

Lange, E. und Kaden, V.*

Es wurde die Entwicklung maternaler Antikörper bei Frischlingen untersucht, welche von drei jungen Bachen abstammten, die einmal durch Verabreichung einer Impfdosis (Schweinepestoralvakzine, Stamm „C“) mittels Spritze vakziniert worden waren. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Höhe der Antikörpertiter bei den Frischlingen vom neutralisierenden Antikörpertiter der Bachen abhängt. Maternale Antikörper konnten nicht länger als 94/96 Tage post natum festgestellt werden. Es scheint, dass die Höhe und damit die Dauer des Vorhandenseins von maternalen Antikörpern bei Frischlingen vom Alter der Sauen zum Zeitpunkt der Vakzination beeinflusst wird.

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

Brauer, A., Lange, E., Adelmann, M. und Kaden, V.*
(in Zusammenarbeit mit Weitschies, W. [Institut für Pharmazie, EMAU Greifswald])

Die ersten Feldversuche zur oralen Immunisierung der Wildschweine gegen Klassische Schweinepest hatten gezeigt, dass die Immunisierung ein zusätzliches Mittel zur CSF-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 Seroprevalenzraten lagen jedoch auch bei diesem Impfmodell unter denen der älteren Wildschweine. Deshalb wurde die Entwicklung optimierter (kleinerer) Köder begonnen. Es wurden drei Köderformen hergestellt und Aufnahmestudien an Haus- und Wildschweinen durchgeführt. Die ersten Untersuchungen zeigten, dass runde Köder besser als kubische Köder aufgenommen werden. Sehr junge Wildschweine nahmen jedoch keine der überprüften Köderformen effizient auf. Gegenwärtig finden erste Immunisierungsstudien unter Verwendung einer neuen runden Köderform sowie C-Stammvakzine statt.

Vergleichende Studien zur Virulenz und Pathogenese von zwei CSFV-Feldisolaten, Genotyp 2.3 *Rostock*, bei Wildschweinen unterschiedlichen Alters

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

Die Untersuchungen zur Charakterisierung von CSFV-Feldisolaten vom Wildschwein wurden durch vergleichende experimentelle Studien am Tier fortgeführt. Zum Einsatz kamen zwei Feldisolate des Genotyps 2.3 Rostock, isoliert vom Schwarzwild aus endemisch verseuchten Gebieten der Bundesländer Mecklenburg-Vorpommern und Rheinland-Pfalz, welche Wildschweinen im Alter von sieben Wochen bis 18 Monaten intranasal verabreicht wurden. Auf Grund des klinischen Bildes, der transienten Virämie, der Virusausscheidung und der pathologisch-anatomischen Befunde sowie des negativen Erreger- bzw. Genomnachweises am Ende des Experimentes wurde der Subtyp 2.3 *Rostock* als mäßig virulent bewertet. Es erkrankten und verendeten nach Infektion ausschließlich Tiere, die auch von einem sekundären Pathogen (*P. multocida*) befallen waren. Dies unterstreicht die Rolle von Sekundärinfektionen für das Auftreten klinischer Erscheinungen bzw. von Todesfällen wie auch für die Verbreitung abgeschwächter Virusstämme im Feld.

Immunantwort von Schweinen gegen das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) 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)

Die Impfung mit Markervakzinen gegen klassische Schweinepest (CSF) 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 das Glykoprotein E2 des CSFV exprimiert, entwickelt und sein immunogenes Potenzial in Schweinen getestet. Die Bildung neutralisierender Antikörper und die Sekretion von Gamma-Interferon (IFN-Gamma) wurden sowohl zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer einmaligen bzw. zweimaligen Injektion als auch nach einer letalen Belastungsinfektion untersucht. Die virale Vektorvakzine induzierte einen guten Schutz nach einer einzelnen intramuskulären Injektion. Das Auftreten geringer Titer CSFV neutralisierender Serumantikörper korrelierte gut mit dem Impfschutz. Zusätzlich zeigte eine signifikant divergierende Zahl von IFN-Gamma produzierenden Zellen nach *In-vitro*-Stimulation von PBMC einen Schutz an. Auch konnte eine Virusausbreitung auf nicht geimpfte Tiere nicht gefunden werden. Eine “multi-site“-Anwendung der Vektorvakzine zeigte sich einer Applikation nur an einer Stelle überlegen.

Zusammenhang des Auftretens der Schweinepest bei Haus- und Wildschweinen in den Jahren 1993 - 2004

Teuffert, J.*, Staubach, C. und Fritzemeier, J.

Die Hausschweinepestfälle der letzten Jahre traten in Gebieten auf, die von Wildschweinepest betroffen waren, so z. B. in Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Niedersachsen und Rheinland-Pfalz. Dabei war der analysierte Virussubtyp in den Hausschweinebeständen identisch mit dem in der Umgebung der Hausschweinebestände bekannten und nachgewiesenen Virussubtyp bei den Wildschweinen. Es ist davon auszugehen, dass in Gebieten, in denen CSF-Virus in der Wildschweinpopulation zirkuliert, ein deutlich höheres Einschleppungsrisiko für Hausschweine besteht als in Gebieten ohne eine CSF-Problematik bei Wildschweinen. Das wird insbesondere immer dann relevant, wenn Mängel in der seuchenhygienischen Absicherung der Schweinehaltungsbetriebe bzw. ihrer Bewirtschaftung vorliegen.
Bei den Primärausbrüchen (31 % der CSF-Ausbrüche insgesamt) standen die Einschleppung über direkte und indirekte Kontakte zu infizierten Wildschweinen (61 %) und die Verfütterung von kontaminierten Speise- und Küchenabfällen (22 %) im Vordergrund. Für den Rest (17 %) ergaben sich weder aus der Betriebskontrolle, seiner Ver- und Entsorgung noch der Umgebung Hinweise für eine Einschleppungsursache der Schweinepest.

Genotypanalysen aktueller Pestivirusisolate
Strebelow, G.*

Die Arbeiten zur Genotypisierung von Pestivirusisolaten wurden fortgeführt. Klassische Schweinepest (CSF) bei Hausschweinen ist 2004 nicht aufgetreten. Einzelne CSFV-Isolate von Wildschweinen wurden untersucht. Alle Isolate stammen aus Rheinland-Pfalz und sind vom Subtyp 2.3 *Uelzen*.
Isolate anderer Pestiviren wurden aus Niedersachsen und aus Sachsen untersucht. Bei dem Fall aus Niedersachsen handelte sich um BVDV-2. Das Isolat ist identisch mit einem Isolat aus 2000 (D16/00; BVDV-2 Potsdam) und steht dem Isolat München 3 sehr nahe. In dem Fall aus Sachsen wurde ein BVDV-1b diagnostiziert. Auch dieses Isolat ist älteren deutschen Isolaten sehr ähnlich.
Die Charakterisierung von CSFV-Isolaten wurde weiter voran getrieben. Neben den bisher sequenzierten Abschnitten des CSFV-Genoms wird nun zusätzlich ein 546 bp-Fragment (entspricht 2839-3385 Alfort) aus dem E2-Bereich des Genoms und ein 436 bp-Fragment (entspricht 11847-12283 Alfort) sequenziert.

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 Charakterisierung neuer Virusisolate, der Erforschung biologischer Mechanismen und der Schaffung von Grundlagen für die Herstellung besserer Vakzinen.

Identifizierung und Charakterisierung von funktional relevanten und attenuierenden Mutationen
Bernhard, R., Ege, A., Meyers, G.* und Tews, B.

Das Auftreten zytopathogener (zp) Varianten des BVDV in Tieren, die persistent mit nicht-zytopathogenen (nzp) BVDV infiziert sind, steht in direktem Zusammenhang mit der Entstehung der MD. Zp BVDV stellen natürliche Mutanten der nzp Viren dar. Die für zp Viren spezifischen Genomveränderungen führen zur dauerhaften Expression des viralen Nichtstrukturproteins NS3, indem sie die Regulation einer Proteasespaltung des viralen Polyproteins verhindern. Diese Proteasespaltung wird im Detail untersucht. In einem zuletzt verfolgten Ansatz wurde der Einfluss von Mutationen im Bereich der bekannten Spaltstelle auf die Proteinspaltung, Lebensfähigkeit und den Phänotyp der Virusmutanten analysiert. Varianten mit deutlich eingeschränkter oder blockierter Prozessierung waren entweder nicht lebensfähig oder revertierten sehr schnell zum Wildtyp. Eine Reihe von Spaltstellenmutanten

konnte jedoch als stabile Virusvarianten erhalten werden. Diese Viren werden zzt. detaillierter analysiert.
Als Basis für die Entwicklung von attenuierten Lebendvakzinen wurden BVDV-2 Mutanten hergestellt, bei denen durch Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren nicht essenzielle virale Funktionen gestört sind. Inaktiviert wurde dabei die RNase Funktion des Strukturglykoproteins E^{rns}. Außerdem wurden Mutanten hergestellt, in deren Genom die Sequenz, die für das virale Nichtstrukturprotein N^{pro} kodiert, weitgehend deletiert wurde. N^{pro} ist eine Protease und interferiert mit der angeborenen Immunantwort von Zellen gegen eine virale Infektion. Die Deletion führte zu einer signifikanten Einschränkung der Virusvermehrung in der Zellkultur. Beide Typen von Virusmutanten erwiesen sich im Tierversuch als attenuiert. Diese Virusvarianten werden derzeit auf ihre Eignung als Lebendvakzinen getestet. Darüber hinaus wird daran gearbeitet, Möglichkeiten zur Markierung von BVDV zu schaffen, die es erlauben, geimpfte Tiere von Feldvirus-infizierten Tieren zu unterscheiden. Die Kombination solcher Veränderungen mit den o. g. attenuierenden Mutationen soll zu Markerimpfstoffen führen, die einen deutlichen Vorteil bei Bekämpfungsprogrammen gegen die BVD/MD darstellen würden.

Immunisierung mit verpackten BVDV-Replikons
Semmler, I., Reimann, I., Adam, G., Reichelt, D. und Beer, M.*

BVDV-Replikons mit einer Deletion im Bereich der Kapsidprotein-kodierenden Region wurden in einer alle BVDV-Strukturproteine konstitutiv exprimierenden Zelllinie effizient verpackt. Diese BVDV-Pseudoviren wurden zur Immunisierung von Rindern verwendet. Hierbei konnte bei zweimaliger Applikation von etwa 10^6 IU/Tier im Abstand von vier Wochen eine belastbare BVDV-Immunität aufgebaut werden. Durch eine einmalige Immunisierung wurde dagegen keine „sterile Immunität“ erreicht. In keinem Fall kam es zu nachweisbarer Rekombination, Reversion oder Ausscheidung der Impfviren. Verpackte Replikons stellen somit die Basis für eine neuartige, sichere und effiziente BVDV-Vakzine dar.

Bicistronische BVDV-Replikons als Expressionssystem
Burghardt, K., Reimann, I.*, Adam, G., Reichelt, D. und Beer, M.

Autonom replizierende, bicistronische BVDV-Replikons wurden konstruiert, die entweder in der 5´-terminalen Region oder innerhalb des 3´-nicht-translatierten Bereiches ihres Genoms eine funktionelle EMCV-IRES beinhalten. Durch Insertion von Markergenen oder fremden viralen Genen wurden rekombinante Replikons erhalten, die in empfänglichen bovinen Zellen auf ihre Replikationsfähigkeit und die Expression der Fremdgene getestet wurden. BVDV-Replikons, die Gene des bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) exprimierten, wurden weiterhin auf ihre Fähigkeit getestet, entsprechende BHV-1 Deletionsmutanten *in trans* zu komplementieren. Die Bereitstellung des Tegumentproteins VP22 durch ein BVDV Replikon erlaubte die erfolgreiche Komplementierung des in seiner Zellausbreitung stark eingeschränkten BHV-1 BAC2ΔUL49. Wie hier am Beispiel einer BHV-1 Mutante zum ersten Mal beschrieben, eröffnen BVDV-Replikons interessante neue Ansätze für Studien zur *In-vitro*-Charakterisierung von viralen Deletionsmutanten.

Mutagenese des putativen BVDV-Fusionspeptids
Reimann, I.*, Adam, G., Reichelt, D. und Beer, M.

Vergleiche von Sequenzen des BVDV Hüllproteins E2 mit denen funktionell verwandter Proteine der ebenfalls zu den Flaviviren zählenden Erreger Virus der Frühsommermeningo-enzephalitis und Hepatitis C Virus ergaben Hinweise darauf, das eine zehn Aminosäuren lange Sequenz im BVDV E2 das virale Fusionspeptid darstellen könnte. Wir haben durch Veränderung dieser Sequenz BVDV Mutanten produziert und diese in Bezug auf ihre Lebensfähigkeit und ihren Phänotyp analysiert. Erste Ergebnisse zeigen, dass zum einen die Länge der untersuchten Domäne entscheidend für die Bildung passagierbarer Virionen ist und dass Konstrukte, die zunächst keine infektiösen Nachkommen bildeten, infektiöse Pseudorevertanten generierten. Diese Mutanten werden weiter analysiert.

Pathogenität eines BVDV-2 Isolats aus Norddeutschland
Liebler-Tenorio, E.*
(in Zusammenarbeit mit Greiser-Wilke, I. [Dept. of Virology, Tierärztliche Hochschule Hannover], Kenklies, S. [Landesamt für Verbraucherschutz, Stendal], Kuhn, E.M. und Makoschey, B. [Intervet International B.V., Boxmeer, Niederlande])

Ziel der Studie war, die Pathogenität eines BVDV-2 Isolates aus Norddeutschland zu untersuchen. Zehn acht bis elf Monate alte Jungrinder wurden mit einem BVDV-2 Isolat infiziert, das aus einer Milchviehherde in Norddeutschland stammte, in der mehrere Kälber mit schweren Blutungen verendet waren. Vier der Jungrinder waren seronegativ (SN) und sechs hatten neutralisierende Antikörper (nAK) gegen BVDV (SP).
Nach der Inokulation waren bei den SN Kälbern milde bis mittelgradige Anzeichen einer respiratorischen Erkrankung begleitet von transientem Anstieg der Körpertemperatur und Virämie zu beobachten. Ähnliche, jedoch schwächer ausgeprägte Symptome zeigten die SP Kälber. In beiden Gruppen waren neutralisierende Antikörper nachweisbar, wobei die Titer gegen BVDV-2 höher waren als die gegen BVDV-1. Histologische Untersuchungen führten zum Nachweis von BVDV-Antigen in verschiedenen lymphatischen Organen von SN und SP Tieren. Die Lymphgewebe zeigten unterschiedlich stark ausgeprägte Depletion.
Die durch das deutsche BVDV-2 Isolat hervorgerufenen klinischen Symptome, Veränderungen und die Virusantigenverteilung entsprechen den Befunden bei BVDV-2 Stämmen mit niedriger Virulenz aus Nordamerika. Trotz milder klinischer Symptome kam es zu einer ausgeprägten Depletion der Lymphgewebe. Die SP Tiere waren nicht gegen die Infektion geschützt; sie verlief jedoch milder und Viruselimination und Erholung erfolgten schneller.

1.4.3 West Nile Virus

West Nile Virus-Surveillance bei Wildvögeln – Erste Ergebnisse und Risikoabschätzung
Schirrmeier, H.*, Hoffmann, B., Globig, A., Müller, T. und Werner, O.

In einer ersten Studie zum Vorkommen von West Nile Virus (WNV) bei Wildvögeln wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren insgesamt 323 gepoolte Rachen- und Kloakentupferproben, die insgesamt über 1.000 Tiere repräsentieren, auf Vorhandensein von WNV bzw. WNV-Genom untersucht. Dazu wurden Virusisolierungsversuche über Zellkulturen durchgeführt sowie zwei verschiedene RT-PCR-Methoden, die nunmehr validiert für die klinische Falldiagnostik verfügbar sind, etabliert. Im Ergebnis konnte in keiner der Proben WNV nachgewiesen werden. Das zeigt, dass die Gefahr eines unmittelbaren Eintrages

von Virus über Zugvögel in die einheimische Standvogelpopulation gering ist. Auch gibt es keine klinischen Daten oder anderweitigen diagnostischen Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass das WNV in Deutschland derzeit ein signifikantes Pathogen darstellt. Schwer vorhersagbare Faktoren wie die Dynamik der Verteilung von Erregerreservoiren und Vektoren, Virulenzveränderungen, Klimastruktur u. a. m. können jedoch durchaus zu Änderungen in der Infektionsintensität und Wirtsempfänglichkeit führen, so dass ein passives Monitoring bei Pferden, Vögeln und beim Menschen, einschließlich der Verfügbarkeit der notwendigen Labormethoden, notwendig ist. Für eine aktive Surveillance in größerem Umfang scheint dagegen derzeit keine zwingende Notwendigkeit zu bestehen.

1.5 RHABDOVIREN

1.5.1 Tollwut-Virus

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

Tollwutgeschehen in Deutschland 2004

Mit insgesamt 35 Tollwutfällen wurde 2004 zum ersten Mal seit vier Jahren wieder eine Zunahme der sylvatischen Tollwut in Deutschland registriert. Neben dem langjährigen Vorkommen eines Tollwutresidualherdes in den suburbanen bzw. urbanen Gebieten Südhessens trat die Tollwut Anfang Dezember erstmals wieder seit 1996 in Baden-Württemberg auf. Der Tollwutverdacht bei einem Fuchsrüden aus der Gemeinde Elztal-Mucktal (Neckar-Odenwald-Kreis) wurde durch weitere Untersuchungen des nationalen Referenzlabors (NRL) für Tollwut des FLI in Wusterhausen bestätigt. Mitte Dezember 2004 wurde bei vier weiteren Füchsen im selben Landkreis ebenfalls Tollwut diagnostiziert. Ein epidemiologischer Zusammenhang mit dem Geschehen auf hessischer Seite ist nahe liegend.
Die mit der Tollwut-Verordnung verbundenen hoheitlichen Aufgaben konzentrierten sich damit auch 2004 auf epidemiologische Ursachenermittlungen, Auswertungen der oralen Impfkampagnen sowie auf die Optimierung der Impfstrategie.

Vorhersagemodell für potenzielle Risikogebiete

Schwerpunkt der epidemiologischen Forschung bildete die Entwicklung eines Modells zur prognostischen Bestimmung potenzieller Risikogebiete für die sylvatische Tollwut in Hessen und den angrenzenden Gebieten benachbarter Bundesländer. Die exakten Abwurfkoordinaten der Impfköder aus den Impfkampagnen der Jahre 2003 und 2004, die charakteristischen topographischen Parameter sowie die georeferenzierten Tollwutfälle wurden in einer neuartigen Kombination aus geographischem Informationssystem (GIS) und logistischer Regression ausgewertet und validiert. Die Ergebnisse des Modells dienen der Optimierung der Impfmaßnahmen und waren Grundlage bei der Planung einer Notfallimpfung Ende Dezember in der betreffenden Region. Das Modell soll weiterhin validiert und auch für zukünftige Planungen eingesetzt werden. Des Weiteren wurde eine Simulation zweier Impfstrategien für eine Notimpfung abgeschlossen.

DNA-Sequenzierung von Impfstämmen

Nur vom Tollwutimpfvirus SAD B19 ist die komplette Sequenz eines attenuierten Tollwutlebendimpfstoffes verfügbar. Sämtliche derzeit eingesetzten Tollwutlebendimpfstoffe für die orale Immunisierung sind SAD-Derivate und bislang genetisch nicht ausreichend voneinander unterscheidbar. Deshalb wurde 2004 begonnen, das gesamte Virusgenom von sechs kommerziell verfügbaren attenuierten Tollwutlebendimpfstoffen sowie der SAD-Feldisolate komplett zu sequenzieren. Nach dem ersten Nachweis von Impfvirus bei Füchsen

aus Impfgebieten im Jahre 2003 wurden 2004 zwei weitere SAD-Nachweise bei Jungfüchsen in Österreich und Nordrhein-Westfalen bestätigt. Während die Typisierung mittels anti-Nukleokapsid monoklonalen Antikörpern bei drei der vier Isolate für das Vorliegen einer atypischen Fuchstollwutvariante sprach, ergaben die bisherigen Daten der Sequenzierung von Abschnitten der für das Nukleophospho- und das Glykoprotein kodierenden Gene eine hohe Sequenzhomologie mit SAD-Stämmen.
Mit der vollständigen Sequenzierung der Impfviren und der Feldisolate sollen Fragen nach (i) diagnostisch verwertbaren Sequenzunterschieden in Impfstoffvirusgenomen sowie (ii) der Identität und eventuellen genetischen Veränderungen der SAD-Isolate sowie (iii) deren möglichen Auswirkungen auf die Virulenz bzw. den Grad der Attenuierung beantwortet werden. Bislang wurde ca. die Hälfte der 12.000 Basen langen Genome sequenziert. Zusätzlich wurde mit der experimentellen Prüfung der SAD-Isolate begonnen. Dazu wurden zwei Gruppen mit jeweils zwei Füchsen (N=4) mit jeweils einem SAD-Isolat intramuskulär (i.m.) infiziert und über einen Zeitraum von 90 Tagen beobachtet. Keines der Tiere entwickelte klinische Tollwutsymptome. Die experimentellen Studien werden mit den anderen SAD-Isolaten fortgeführt.

Fledermaustollwut
Die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Pathogenität Europäischer Fledermausviren (EBLV) für andere terrestrische Tierarten wurden fortgesetzt. Jeweils zwei Gruppen von vier Schafen (N=8) wurden experimentell mit hohen Dosen ($10^{4,9}$ MLD/ml) von EBLV1 & 2 infiziert. Nach intrazerebraler Inokulation mit EBLV-1 &-2 verendeten die Tiere unter klinischen Symptomen nach durchschnittlich zehn bzw. 17 Tagen post infectionem. Nach i.m. Inokulation traten unregelmäßige klinische Erscheinungen auf. Bis auf ein EBLV1-infiziertes Tier, das elf Tage p.i. starb, überlebten die übrigen Tiere einen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. Die Studien scheinen Ergebnisse experimenteller Infektionen bei Füchsen zu verifizieren, bei denen ähnliche Ergebnisse erzielt wurden.
Die 2004 fortgeführte aktive Surveillance in frei lebenden Fledermäusen ergab erstmals serologische Hinweise auf das Vorkommen von EBLV-Infektionen in Brandenburg. Bei zwei Tieren einer Breitflügelfledermauskolonie mit einer Stärke von ca. 25 - 35 Tieren wurden hohe virusneutralisierende Antikörper (>1:80) gegen EBLV-1 gefunden. Die Tiere zeigten keinerlei klinische Symptome. Interessanterweise waren dieselben Tiere schon in vergangenen Jahren gefangen worden, ohne serologisch positiv gewesen zu sein.

Monoklonale Antikörper für die passive Impfung von Menschen
Im Rahmen des WHO-Projekts zur Entwicklung eines monoklonalen Antikörper (mAk)-Cocktails für die post-expositionelle Impfung beim Menschen wurden die *In-vitro*-Testungen der fünf potenziellen anti-Tollwutglykoprotein-mAk Kandidaten (darunter mAk E559 des FLI) mit verschiedenen Lyssavirus-Genotypen und Tollwutvirusvarianten unterschiedlicher geographischer Herkunft vervollständigt. Zur Identifizierung der Bindungsstelle von E559 wurde eine Escape-Mutante hergestellt, deren Glykoprotein-kodierende Sequenz anschließend sequenziert und mit der des Ausgangsvirus verglichen werden soll.

Herausgabe des Rabies Bulletin Europe
Pötzsch, C.J.*

2004 wurde die vierteljährliche Erstellung des Rabies Bulletin Europe (RBE) sowie dessen Weiterentwicklung fortgeführt. Erstmals in der Geschichte des RBE konnten Daten über die Anzahl der jährlich untersuchten Tollwutproben der europäischen Länder ausgewertet und mit den Falldaten verglichen werden. Durch intensive Kontakte mit den amtlichen Veterinär- und

den Tollwutuntersuchungseinrichtungen der europäischen Länder sowie der Nutzung einfacher und standardisierter Meldeformate konnten Daten aus fast allen europäischen Ländern mit Tollwutvorkommen erhoben werden (siehe dazu auch: Rabies Bulletin Europe. 2003. 27(4), 18 und Pötzsch, CJ. 2004. Rabies surveillance in Europe. Rabies Bulletin Europe. 28(1), 6-10).
Weiterhin wurde der Internetauftritt des RBE informativer und nutzerfreundlicher gestaltet (www.who-rabies-bulletin.org).
Das RBE wurde 2004 in einer Auflagenstärke von 370 - 400 Exemplaren weltweit versandt. Auf die Internetversion erfolgen monatlich ca. 22.000 - 60.000 Zugriffe und ca. 1.200 - 2.500 Besuche.

Weitere Projekte

Empfänglichkeit von Schafen gegenüber EBLV
Müller, T.*, Lange, E., Vos, A., Fooks, A.R., Brookes, S., Johnson, N., Teifke, J. Klopfleisch, R. und Kaden, V.

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

Komplette Nukleotidsequenzierung von attenuierten SAD-Tollwutimpfstoffen
Müller, T.*, Geue, L., Ulrich, R. und Vos, A.

Genotypische Charakterisierung von SAD-assoziierten Tollwutfällen
Müller, T., Geue, L.*, Ulrich, R., Vos, A. und Fooks, A.R.,

Genotypische Charakterisierung von European Bat Lyssavirus Isolaten aus Deutschland
Müller, T.* und Geue, L.

Etablierung einer Real-Time Tollwut-RT-PCR
Müller, T.* und Hoffmann, B.

Tollwutsurveillance post vaccinationem und Notfallimpfung
Selhorst, T.*, Thulke, H.H. und Müller, T.,

Afrikanische Wildkarnivoren als Träger des Tollwutvirus ohne Krankheitszeichen
Müller, T., Hofer, H. und East, M.*

Erhebung und Auswertung von Tollwutdaten aus Europa
Pötzsch, C.J.* und Kliemt A.

Die epidemiologische Aussagefähigkeit eines auf topografischen Rastern basierten Systems der Tollwutberichterstattung
Pötzsch, C.J.*, Rybakow, S.S., Grusdew und Staubach, C.

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

Die Erreger der Infektiösen Hämatopoetischen 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. Das Genom dieser Erreger wurde vollständig kloniert und sequenziert. 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 Novirhabdovirus) für ein zusätzliches Gen NV, das in reifen Virionen bislang nicht nachgewiesen werden konnte. Das kalkulierte Molekulargewicht des aus 111 Aminosäuren bestehenden Proteins des IHNV beträgt ca. 13 kDa. Das NV Protein des IHNV ist für eine effiziente Virusreplikation essenziell und stellt einen Pathogenitätsfaktor dar (Thoulouze et al., 2004).

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

Die Studien zur Phylogenie der in Europa zirkulierenden IHN-Stämme wurde mit Isolaten aus der Schweiz fortgesetzt. Die Schweizer Isolate lassen sich problemlos in den europäischen IHNV-Stammbaum eingliedern. Auch hier konnte dieselbe Abstammung wie bei den übrigen europäischen Stämmen festgestellt werden, Virusstämme des Genotyps „M" aus dem „Columbia River Basin" an der Westküste von Nordamerika. Weiterhin konnte die Beobachtung bestätigt werden, dass sich das IHNV in Europa inzwischen in zwei Subtypen aufspaltet, die als italienische Linie und französische Linie differenziert werden können. Verschiedene Schweizer Isolate gehören zur französischen Linie, andere zur italienischen Linie. Es wird vermutet, dass das IHNV aus beiden Ländern, in denen die IHN zuerst aufgetreten war, in die Schweiz eingeschleppt wurde.

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

Das vorhandene Datenmaterial zu VHSV-Stämmen wurde durch weitere regionale Untersuchungen an neuen Virusisolaten erweitert. Verschiedene Isolate aus Sachsen sowie aus Baden-Württemberg wurden dazu genutzt, regionale VHS-Epizootien auf gemeinsame Einschleppungswege zu untersuchen. In Sachsen sind es in der Hauptsache zwei Stämme, die immer wieder regionale Ausbrüche verursachen. Beide gehören unterschiedlichen Genogruppen an, SE1 und SE2.
In Baden-Württemberg wurden wiederholte VHS-Ausbrüche in einem abgegrenzten Gebiet untersucht. Die hier vorgefundenen Isolate gehören zur Genogruppe SE2, bilden aber eine klare Untergruppe mit der Tendenz zu einer regionalen Weiterentwicklung zu Subtypen.

Entwicklung einer VHS-Oralvakzine zur Immunisierung von Forellen

Adelmann, M., Bergmann, S.M., Fischer, U., Köllner, B. und Fichtner, D.*
(in Zusammenarbeit mit Lange, B. [Riemser Arzneimittel AG, Riemserort] und Weitschies, W. [Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald])

Fischseuchen wie die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) können große wirtschaftliche Schäden in der Aquakultur verursachen. Die Strategie der Europäischen Union zur Bekämpfung von Fischseuchen besteht in der weiteren Zurückdrängung der Krankheiten durch regelmäßige Überwachung der Fischbestände und darauf basierende gesetzliche Maßnahmen, wie die tierseuchenrechtliche Zulassung nachweislich seuchenfreier Fischhaltungsbetriebe, Gebiete oder Länder verbunden mit Handelsbeschränkungen für Fische aus nicht zugelassenen Beständen. Bei amtlicher Feststellung der Fischseuchen in einem Fischhaltungsbetrieb sind die seuchenkranken oder seuchenverdächtigen Fische zu töten und unschädlich zu beseitigen. Die gezielte Immunprophylaxe ist eine weitere Möglichkeit, Forellen gegen eine Infektion mit VHS-Virus zu schützen und eine störungsfreie Produktion zu sichern.
Die orale Applikation von Lebendimpfstoffen, z. B. unter Verwendung eines attenuierten, avirulenten VHS-Virus in geeigneten Arzneiformen, ist eine Möglichkeit, große Populationen von Fischen ohne Stress für die Tiere mit möglichst geringem Arbeitsaufwand effektiv zu immunisieren. In Vorversuchen konnten wir die Virusaufnahme über den Darm sowie die darauf folgende Virusvermehrung im Fisch nachweisen. Das VHS-Virus ist labil gegenüber niedrigen und hohen pH-Werten, hohen Temperaturen und organischen Lösungsmitteln. Deshalb sind sowohl beim Herstellungsprozess der Arzneiform als auch bei der oralen Applikation und Passage im Fisch schonende, nicht das Virus inaktivierende Bedingungen zu sichern.
Es wurde eine Arzneiform entwickelt, die durch ein neuartiges Prinzip der Freisetzung der Impfviren im Fisch gekennzeichnet ist. Im Tierversuch konnte die Wirksamkeit dieser Präparate nachgewiesen werden. Dabei wurden verschiedene Trägersubstanzen und Hilfsstoffe getestet. Die Mortalität der Kontrollgruppe betrug 70 %, die der oral immunisierten Gruppen 13,5 bzw. 22,9 %. Ein signifikanter Schutz der oral immunisierten Forellen nach Belastungsinfektion konnte induziert werden. Genom des VHS Vakzine-Virus wurden im Darm, in den Organen und im Blut der oral immunisierten Fische mittels RT-PCR nachgewiesen. Mittels ELISA erfolgte die Bestimmung des Antikörpertiters im Serum der Fische. Erste Untersuchungen zur Virusstabilität in den Präparaten zeigten, dass sechs Monate nach deren Herstellung kein Abfall des Virustiters zu verzeichnen ist, wenn die Präparate bei -20 °C gelagert werden.
Weitere Tierversuche zum Nachweis der Wirksamkeit und Sicherheit werden durchgeführt. Dabei wird die minimal wirksame Dosis bestimmt. Es gilt auch, die Unschädlichkeit der Oralpräparate für Wildfische, z. B. für Bachforellen, nachzuweisen.

Untersuchung der Molekularbiologie von fischpathogenen Rhabdoviren (IHNV, VHSV, SVCV) – Charakterisierung von rIHNV-Deletionsmutanten in Zellkultur

Schütze, H.* und Hoffmann, B.

In Untersuchungen zum Phosphoprotein der Mononegavirales wurden überlappende offene Leserahmen (ORF) identifiziert. Ein zweiter ORF ist in Überlappung mit dem Phosphoprotein-Gen des IHNV lokalisiert. Das abgeleitete Protein weist ähnliche Eigenschaften wie das C-Protein des VSV (New Jersey, Indiana Virus, Chandipura Virus und Piry Virus; *Familie Rhabdovirus*, *Genus Vesiculovirus*) und des Tollwutvirus (*Familie Rhabdovirus*, *Genus Rabies Virus*) auf. Das aus 42 Aminosäuren (aa) bestehende C-Protein des IHNV ist ebenfalls sehr basisch und enthält einen hohen Anteil der Aminosäure Arginin. Im Gegensatz zum C-Protein

der *Rhabdoviridae* VSV und RV und der *Paramyxoviridae* konnte in IHNV infizierten Zellen kein Translationsprodukt des ORF C nachgewiesen werden.
Mit Hilfe des reversen genetischen Systems wurden rekombinante IHN Viren (rIHNV) generiert, die eine Deletion des C-Gens aufweisen. Ziel der Arbeiten war, den Einfluss des C-Proteins des IHNV auf die Replikation zu analysieren. In Wachstumskinetiken wurden rIHNV in Anwesenheit des C-Proteins mit entsprechenden Deletionsmutanten verglichen. Untersucht wurden auch rIHN Viren mit deletiertem NV-Gen.
rIHNV zeigten im Vergleich zu IHNV-Wildtypviren (wtIHNV) keinen Unterschied in ihrem Wachstumsverhalten. Ein Fehlen des NV-Proteins führte jedoch zu einem deutlichen Wachstumsnachteil. Das Virus replizierte wesentlich langsamer und wies einen 100- bis 1.000-fach reduzierten Titer auf. Eine Deletion des C-Proteins hingegen hatte keinen messbaren Einfluss auf die Virusreplikation in der Zellkultur. *In vitro* konnte kein Unterschied zu rIHN und wtIHN Viren festgestellt werden.
Im Gegensatz dazu konnten keine rekombinanten Viren bei gleichzeitiger Abwesenheit von C und NV generiert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass das C-Protein allein für die virale Replikation *in vitro* entbehrlich ist. Fehlt jedoch gleichzeitig das NV-Protein, so findet keine Virusvermehrung in der Zellkultur statt.
Ob das C-Protein die Pathogenität von IHN-Viren beeinflusst, muss in Infektionsversuchen analysiert werden.

1.6 PARAMYXOVIREN

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

Das Newcastle Disease Virus (NDV), Genus *Avulavirus* in der Familie der *Paramyxoviridae*, ist in seiner virulenten Form der Erreger der atypischen Geflügelpest, die eine Vielzahl von Vögeln infizieren kann und weltweit große Verluste beim Wirtschaftsgeflügel verursacht. In Deutschland besteht Impfpflicht für alle Hühner- und Putenbestände.
Die NDV-Isolate werden entsprechend ihres intracerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) in verschiedene Pathogenitätsgruppen (lentogen, mesogen, velogen) eingeteilt. Entsprechend der EU-Richtlinie 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 umhülltes 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 Haemagglutinin-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 das NDV ist die Möglichkeit gegeben, sowohl gezielt nach den molekularen Ursachen für die unterschiedliche Pathogenität der Virusisolate zu forschen als auch das Virus als Vektor für Fremdgene zu nutzen und z. B. rekombinante Vektorimpfstoffe zu entwickeln.

Untersuchung der molekularen Grundlagen von Pathogenität und Attenuierung des NDV
Römer-Oberdörfer, A.*, Veits, J. und Werner, O.

Es wurde bereits gezeigt, dass Veränderungen einzelner Aminosäuren im Fusions- und/oder Hämagglutinin-Neuraminidase Protein des lentogenen Impfstamms Clone 30 zu einer drastischen Erhöhung des ICPI bis maximal 1,56 führen, wohingegen der intravenöse

Pathogenitätsindex (IVPI) mit 0,03 das Vorliegen eines velogenen Virus ausschloss. Beim Nachweis des HN-Proteins im Western Blot zeigten die Rekombinanten mit der veränderten Aminosäure 123 des HN ein deutlich anderes Laufverhalten, welches auf eine Dimerisierung des Proteins schließen lässt.

Entwicklung rekombinanter Vektorimpfstoffe auf der Basis des Newcastle Disease Virus
Römer-Oberdörfer, A.* und Veits, J.

Eine erste NDV-Rekombinante, die das H5 des aviären Influenzavirus (AIV) exprimiert, wurde in einem Tierversuch auf ihre Schutzwirkung gegen die klassische Geflügelpest nach Belastungsinfektion mit einem Influenzavirus des Subtyps H5N2 getestet. Die Tiere waren zwar vor einer letalen AIV-Infektion geschützt, zeigten jedoch deutliche Symptome der Geflügelpest. Die nicht zufrieden stellende Schutzwirkung bestätigte sich nach Auswertung der genommenen Tupferproben. Das hoch pathogene AIV wurde noch bis Tag 14 nach Belastungsinfektion (p.c.) ausgeschieden. Dagegen konnte am Tag 2 p.c. bei keinem der Tiere, die eine letale Dosis eines velogenen NDV-Stammes erhielten, eine Ausscheidung des NDV-Challengevirus am Tag 2 p.c. nachgewiesen werden.
Um eine gesteigerte Expression des Fremdgens zu erzielen, wurde das H5-Gen des AIV nun an unterschiedlichen Orten des NDV-Genoms inseriert. Bisher konnte von einem dieser als Plasmide vorliegenden Konstrukte rekombinantes Virus generiert werden, das derzeit charakterisiert wird. Nach Erhalt weiterer Rekombinanten wird die Fremdgenexpression verglichen und die Schutzwirkung *in vivo* geprüft.

Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von NDV-Isolaten auf Krebszelllinien
Kühnel, D., Veits, J. und Römer-Oberdörfer, A.*

In der Krebstherapie werden NDV in unterschiedlicher Form immer wieder zum Einsatz gebracht. In diesem Projekt soll untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Pathogenität des Isolates und der zytotoxischen Wirkung besteht. Dazu wurden verschiedene im nationalen Referenzlabor für NDV vorhandene NDV-Isolate ausgewählt, die sich im ICPI unterscheiden. Mit Hilfe eines Proliferationsassays wird untersucht, welche dieser Isolate eine zytotoxische Wirkung auf ausgewählte Krebszelllinien haben. Parallel dazu wird untersucht, wie sich die Isolate in ihrem Replikationsverhalten unterscheiden und welche Sequenzmerkmale sie in den Oberflächenproteinen F und HN aufweisen.

Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen NDV
Köllner, B. und Römer-Oberdörfer, A.*

Bereits vorliegende, durch Hämagglutinationshemmtest und ELISA charakterisierte monoklonale Antikörper, die gegen zwei verschiedene pathogene NDV Isolate hergestellt worden waren, wurden auf ihre Spezifität gegen einzelne Proteine des Impfstammes Clone 30 untersucht. Dazu wurden Expressionsplasmide hergestellt, die die offenen Leserahmen der jeweiligen Proteine des NDV Clone 30 enthalten. Die Testung der vorhandenen mAks ergab folgende Spezifitäten: anti-HN (mAk952), anti-P (mAk 208), anti-NP (mAk.209), anti-M (mAk.951) und anti-F (mAk.57). Dies wurde im Western Blot für NP, P und HN bestätigt. Damit liegen mAk vor, die sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Western Blot zum Nachweis des jeweiligen NDV-Proteins eingesetzt werden können.

Untersuchung des ND-Immunstatus bei Hühnern und Puten in Deutschland
Werner, O.*

In der Geflügelpest-VO ist festgelegt, dass alle Hühner- und Putenbestände in solchen Abständen gegen Newcastle Disease zu impfen sind, dass im gesamten Bestand eine ausreichende Immunität der Tiere gegen ND vorhanden ist. Eine serologische Kontrolle des Immunstatus ist behördlicherseits nicht vorgeschrieben.
In einer Stichprobe wurden deutschlandweit 45 Legehennen-, 34 Masthühner- und 43 Putenbestände auf Antikörper gegen NDV kontrolliert. Untersucht wurden zehn Seren pro Bestand mit dem Hämagglutinations-Hemmungs (HAH)-Test. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass erst HAH-Titer ab 4 log2 eine ND-Mortalität wirksam verhindern, offenbarten die Ergebnisse, dass 4 % der Legehennen-, 23 % der Masthühnchen- und 7 % der Putenbestände als ungeschützt einzustufen waren. Insgesamt hatten in 9 % der Legehennen-, 67 % der Broiler- und 41 % der Putenbestände weniger als 70 % der Tiere eine ausreichende Immunität. Als mittlerer Titer wurde bei Legehennen 6,0 ± 2,4, bei Broilern 3,6 ± 2,0 und bei Puten 4,5 ± 2,6 log2 ermittelt.

Bewertung von kommerziellen ELISA-Tests zur Überprüfung des ND-Immunstatus
Werner, O.*

Seren von 453 Legehennen, 339 Masthühnern und 429 Puten wurden parallel mit zwei kommerziell verfügbaren ELISA-Testkits und mittels Hämagglutinations-Hemmungs (HAH)-Test auf Antikörper gegen Newcastle Disease untersucht. Die ELISA-Ergebnisse wurden nach den Empfehlungen der Hersteller bewertet und mit den Ergebnissen des HAH-Tests verglichen, die bekanntermaßen eine direkte Korrelation zur Schutzrate aufweisen. Beide ELISA-Tests hatten eine sehr hohe Sensitivität von nahezu 100 %, aber eine zu niedrige Spezifität. Das bedeutet, dass zahlreiche im HAH negative Seren im ELISA positiv bewertet werden. Um einer falschen Einschätzung der Immunitätslage in den Geflügelbeständen vorzubeugen, wird deshalb empfohlen, den cut-off für eine positive Bewertung der Seren zu erhöhen, wenn die ELISAs zur Überwachung des Immunstatus eingesetzt werden sollen.

Vorkommen von aviären Paramyxoviren bei Wildvögeln in Deutschland
Globig, A. und Werner, O.*

Von 2.299 Wildvögeln, die zu 74 verschiedenen Arten gehörten, wurden von März 2003 bis September 2004 in elf Bundesländern Tupferproben gewonnen. Diese wurden als 639 Sammelproben mittels Eikultur auf Virus untersucht. In 24 Pools ließ sich aviäres Paramyxovirus (APMV) nachweisen. Neun Isolate wurden serologisch als PMV-1 identifiziert, zehn als PMV-4 und fünf erwiesen sich als PMV-6. Alle Isolate stammten von Wasservögeln (Entenarten, Höckerschwäne, Graugans, Lachmöwe), die auch den Hauptanteil der untersuchten Tiere bildeten. Die positiven Proben wurden in Schleswig-Holstein (Insel Föhr), Sachsen (Raum Dresden), Niedersachsen (Weser-Ems) und Nordrhein-Westfalen (LK Paderborn) gewonnen. Unter den Virus tragenden Vögeln waren sowohl Zugvögel (Krickenten, Pfeifenten, Stockenten) als auch Stand-/Strichvögel (Schwäne, Möwen). Alle PMV-1-Isolate sind gering pathogen und stellen wie die PMV-4 und PMV-6 Isolate keine akute Gefahr für die Geflügelhaltung dar.

1.7 BORNAVIREN

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

Studie zur Übertragbarkeit beim Virus der Bornaschen Krankheit im Rattenmodell
Stitz, L.*, Rziha, H.-J. und Planz, O.

In Deutschland zählt die Bornasche Krankheit (BK) zu den meldepflichtigen Erkrankungen. Die BK tritt sporadisch und endemisch auf, wobei der genaue Übertragungsweg bei Pferd und Schaf noch nicht endgültig geklärt ist, vermutlich aber über die aerogene oder orale Route erfolgt. Es wurde gezeigt, dass erheblich mehr Tiere seropositiv sind als in einem gegebenen Zeitraum erkranken. Es ist bis heute nicht klar, ob alle seropositiven Tiere auf dem Wege zur Erkrankung sind, ob der Nachweis von BDV-spezifischen Antikörpern eine nicht manifeste (chronische) Infektion (möglicherweise mit Trägerstatus) anzeigt oder ob diese Tiere nach Infektion zwar nicht erkrankt sind, aber Antikörper gebildet haben. Um die Übertragbarkeit des BDV experimentell *in vivo* überprüfen zu können, wurde ein Rattenmodell entwickelt, bei dem durch neonatale Infektion persistent infizierte, immunologisch tolerante und klinisch unauffällige Tiere entstehen. Der Trägerstatus wird mittels RT-PCR zum Nachweis von virusspezifischer Nukleinsäure im Blut bei gleichzeitiger Abwesenheit virusspezifischer Antikörper mittels ELISA überprüft. Bei direktem Kontakt solcher Trägertiere mit naiven erwachsenen Tieren kommt es zu Infektion und Entwicklung einer Meningoenzephalitis mit tödlichem Ausgang bei den Kontakttieren. Besteht kein direkter Kontakt, so kann eine Infektion auch nicht auf andere empfängliche Tiere übertragen werden. Werden Trägertiere in direkten Kontakt zu neugeborenen, immunologisch unreifen Ratten gebracht, so entsteht eine neue Generation von Trägertieren. Wird mit solchen Trägertieren eine neue Zucht aufgebaut, so zeigt sich, dass nicht mehr alle Nachkommen der einzelnen Muttertiere Träger sind, sondern dass vereinzelt virusfreie Tiere vorhanden sind, die später im Wurf infiziert werden und dann aufgrund ihrer dann bestehenden Fähigkeit immunologisch gegen das BDV zu reagieren an den Folgen der immunpathologischen Reaktion sterben. Werden solche Zuchtversuche in weiteren Generationen durchgeführt, so treten zunehmend weniger Trägertiere auf, diese wenigen Tiere bedingen jedoch aufgrund der Persistenz eine Erhaltung des BDV in der Population. Aus diesen Experimenten schließen wir, dass die Infektionswahrscheinlichkeit sehr stark mit der Virusdosis korreliert ist und, darüber hinaus, dass auch bei der BK nicht erkannte persistent infizierte und immunologisch tolerante Tiere in der Population ein Virusreservoir darstellen können. Diese Beobachtungen lassen sich grundsätzlich auch auf die natürlich auftretende BK der Pferde und Schafe übertragen.

1.8 ORTHOMYXOVIREN

1.8.1 Influenzaviren

Untersuchungen zum Vorkommen von Influenzaviren in der Wildvogelpopulation Deutschlands
Globig, A., Starick, E. und Werner, O.*

Um das Infektionsrisiko von Wirtschaftsgeflügel durch Wildvögel zu bewerten, wurde das Vorkommen von Influenzaviren in Wildvögeln in Deutschland untersucht. Dafür wurden in Zusammenarbeit mit der Beringungszentrale Hiddensee, ehrenamtlichen Vogelberingern, Jägern und weiteren freiwilligen Helfern von März 2003 bis September 2004 deutschlandweit

mehr als 2.000 Wildvögel 74 verschiedener Arten beprobt, insbesondere Vertreter der Ordnungen *Anseriformes* und *Charadriiformes*. Die Proben wurden als 639 Sammelpools mittels Eikultur auf Virus untersucht. Aus ihnen konnten 21 AIV-Isolate gewonnen werden, die acht verschiedene H-Subtypen und sieben N-Subtypen repräsentieren. Auch die potenziellen Geflügelpesterreger H5 und H7 waren dabei, aber alle isolierten Viren erwiesen sich als gering pathogen.
Die meisten Isolate (86 %) stammen von Enten, insbesondere Stockenten, die im Herbst an der Nord- und Ostseeküste gefangen wurden. Da diese Gegend nach den Erkenntnissen der wissenschaftlichen Vogelberingung ein Rast- und Durchzugs- bzw. Überwinterungsgebiet für migrierende Enten darstellt, handelt es sich bei den Virusträgern wahrscheinlich um Zugvögel aus dem nordeuropäischen Raum. In der Nähe solcher Rastgebiete sollte Geflügel nicht im Freien gehalten werden, wenn es nicht regelmäßig auf Influenzavirus untersucht wird.

Analyse des Influenzastatus von Hausgeflügel in Freilandhaltung unter besonderer Berücksichtigung der Infektionsgefährdung durch Wildvögel
Globig, A., Starick, E. und Werner, O.*

Wilde Wasservögel sind das natürliche Reservoir von Influenzaviren. Bei Geflügelhaltungen mit Freilandauslauf besteht deshalb wegen möglicher Wildvogelkontakte ein erhöhtes Infektionsrisiko für aviäre Influenza, das untersucht werden sollte.
In einer deutschlandweiten Stichprobe wurden insgesamt 486 Geflügelbetriebe mit Freilandauslauf auf das Vorkommen von aviären Influenzaviren getestet. Bei 2,9 % der 205 untersuchten Gänsebestände und bei 0,7 % der 143 Entenbestände wurde eine Influenzavirus-Infektion nachgewiesen. Die 117 untersuchten Hühnerbestände sowie die sieben Putenbestände und vierzehn Hobbyhaltungen waren nicht infiziert. Die direkt oder über Antikörper nachgewiesenen Influenzaviren gehörten zu den Subtypen H3, H4, H6 und H12.
Aus den bei der Probennahme im Bestand erfassten Daten zu Haltungs- und Hygieneparametern sowie zu möglichen und wirklich beobachteten Kontakten zu Wildvögeln wurde das spezifische Infektionsrisiko mittels eines Punktesystems eingestuft.
Alle mit Influenzavirus infizierten Betriebe hatten ein mittleres Infektionsrisiko. Obwohl bei ca. 10 % der Haltungen das Infektionsrisiko als sehr hoch eingestuft wurde, scheint die Ansteckung durch Wildvögel ein seltenes Ereignis zu sein. Trotz der geringen Häufigkeit des Viruseintrages durch Wildvögel sollte zur Absicherung der gesamten Geflügelwirtschaft vor der Geflügelpest eine gesetzlich verankerte Überwachung der Geflügelhaltungen mit Freilandauslauf etabliert werden. Sie sollte zweimal jährlich nach dem Vogelzug erfolgen und besonders infektionsgefährdete Bestände umfassen.

Vorkommen von aviärem Influenzavirus bei Wirtschaftsgeflügel in Deutschland
Globig, A. und Werner, O.*

Nachdem im Jahre 2003 in einer repräsentativen Stichprobe deutschlandweit 845 Wirtschaftgeflügelbestände auf aviäres Influenzavirus (AIV) untersucht wurden und nur 0,6 % der Bestände positiv waren, wurde 2004 ein neues Überwachungsprogramm erarbeitet, das sich vor allem auf Freilandhaltungen und andere infektionsgefährdete Bestände konzentriert und bis März 2005 läuft. Im Gegensatz zum Vorjahr werden alle Geflügelarten serologisch untersucht. Da für Enten und Gänse kein ELISA zur Verfügung steht und da wegen der geringen Serokonversionsrate dieser Geflügelarten bei Influenza ein größerer Stichprobenumfang gewählt werden muss, wird im Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) nur auf die AIV-Subtypen H5 und H7 getestet. Hühner- und Putenseren werden mittels ELISA untersucht und

positive Ergebnisse mit dem HAH abgeklärt. Bisher wurden 119 Legehennen-, 58 Puten-, 64 Enten- und 86 Gänsebestände untersucht und dabei zwei positive Bestände ermittelt. In einem Gänsebestand in Nordrhein-Westfalen wurden Antikörper gegen AIV H5 und in einer kleinen Gänsehaltung in Niedersachsen Antikörper gegen H7 nachgewiesen. Obwohl sich kein Virus isolieren ließ, wurden beide Bestände gemerzt. Kontrolluntersuchungen in Nachbarbeständen verliefen negativ.

RT-PCR und Real-time-RT-PCR für die Diagnostik aviärer Influenzaviren

Hoffmann, B., Fereidouni, S., Starick, E.*, Veits, J. und Werner, O.

Im Rahmen der Charakterisierung von Einsendungsmaterial am NRL wurden 2004 insgesamt 101 Proben aus 24 Einsendungen mittels RT-PCR-Tests differenzialdiagnostisch auf AIV und PMV-1 untersucht. Bei Proben mit Verdacht auf AIV wurde parallel dazu mittels RT-PCR der Hämagglutinin (HA)-Subtyp bestimmt. Um Aussagen zur Pathogenität bzw. zur näheren Charakterisierung der Isolate zu gewinnen, wurden darüber hinaus von dreizehn AIV- bzw. PMV-1-positiven Proben die Spaltstellenbereiche der jeweiligen Oberflächenproteine (HA bzw. F) sequenziert.
Zur weiteren Verbesserung und Beschleunigung der molekularbiologischen Diagnostik von AIV wurde damit begonnen, eine real-time RT-PCR zum Nachweis von Influenza A-Viren zu etablieren. Die Untersuchung der Methode anhand von Titrationsreihen von positiver Allantoisflüssigkeit bzw. positiver RNA ergab, dass mit der real-time RT-PCR die gleiche analytische Sensitivität erreicht wurde wie mit RT- und anschließender nested-PCR. Erste Versuche mit in der Virusisolierung charakterisierten Tupferproben (20 positive und vier negative) zeigten jedoch, dass bei solchem Probenmaterial die Sensitivität der real-time RT-PCR geringer sein kann als die von RT- und nested-PCR (4/20 Proben falsch negativ). Bei der Testung von Kotproben von Wildvögeln mit beiden Methoden gab es eine gute Übereinstimmung bei den positiven (6) und negativen (2) Proben. Drei in der real-time RT-PCR bislang als fraglich eingestufte Proben waren in RT- und nested PCR negativ. Diese Untersuchungen, insbesondere unter Einsatz von Organ-, Tupfer- und Kotproben, werden fortgesetzt, um die Leistungsfähigkeit der neuen Methode besser einschätzen zu können.

Entwicklung eines competitiven ELISA (cELISA) für den Nachweis von AIV-spezifischen Antikörpern (Ak)

Starick, E.*, Werner, O. und Schirrmeier, H.

Die Standardmethode für den Nachweis AIV-spezifischer Antikörper ist der Hämagglutinationshemmtest (HAH). Er ist hoch sensitiv und H-subtypspezifisch. Im Gegensatz dazu werden mit ELISA-Systemen Antikörper gegen alle AIV unabhängig vom Subtyp nachgewiesen, so dass diese Tests zur Vorselektion geeignet sind. Sie sind jedoch nur für Hühner- und Putenseren kommerziell erhältlich, für andere Geflügelarten und Wildvögel sind sie bisher nicht verfügbar.
Unser Ziel war es daher, einen cELISA für die Untersuchung von Seren von verschiedensten Geflügel- und Vogelarten zu entwickeln. Die Methode basiert auf dem Einsatz eines rekombinanten AIV-Nukleoprotein (NP)-Antigens und eines kommerziell erhältlichen Anti-NP-monoklonalen Antikörpers (mAk). Anhand HAH-charakterisierter Hühner-, Puten- und Entenseren wurden die Methode etabliert und der cut-off ermittelt. Die im Folgenden durchgeführte Untersuchung von 120 HAH-negativen Enten- und 80 HAH-negativen Gänseseren im cELISA bestätigte die HAH-Ergebnisse. Damit konnte zugleich der cut-off des cELISA (30 % Hemmung des mAk) bestätigt werden: Die Mehrzahl der Seren wies

Hemmungsraten zwischen 0 und 20 % auf; lediglich neun der 200 Seren bewirkten über 25 % Hemmung der mAk-Reaktion. Aus einem Gänsebestand, aus dem später Influenzavirus nachgewiesen werden konnte, wurden 40 Seren untersucht und alle in beiden Methoden positiv getestet. Bei insgesamt vier weiteren Einsendungen mit positiven Proben wurden jedoch sechs von zehn HAH-positiven Seren vom cELISA nicht detektiert. Durch den Einsatz weiterer Methoden (indirekter ELISA, IFT, Western Blot) sollen diese Diskrepanzen abgeklärt werden.

Auftreten von Neuraminidase-subtypspezifischen Antikörpern gegen aviäres Influenza A-Virus nach Immunisierung und heterologem Challenge

Schirrmeier, H.*, Weber, S. und Werner, O.

Der Einsatz von Impfstoffen gegen die aviäre Influenza im Seuchenfall erfolgt nach dem so genannten DIVA-Prinzip (***D****ifferentiating* ***I****nfected from* ***V****accinated* ***A****nimals*). Durch die Anwendung serologischer Tests, die durch Immunisierung induzierte Antikörper von denen durch Feldvirus verursachten unterscheiden, soll das Eindringen von Feldvirus in unter Impfschutz stehende Bestände frühzeitig erkannt werden. Zur Einschätzung der Effektivität einer solchen zur Maßregelung von Geflügelbeständen führenden Diagnostik wurden Gruppen von Hühnern einem Immunisierungs- und Belastungsinfektionsregime unterzogen, das durch unterschiedliche Kombinationen möglichst vielen praktischen Gegebenheiten gerecht wird. Die serologische Untersuchung erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz an die Neuraminidasen (NA) 1, 3 und 7 exprimierenden Zellkulturen. Die Ergebnisse von insgesamt sieben Tierversuchen, in denen Impf- und Belastungsinfektionsvirus in unterschiedlichen Kombinationen (H7/N7, H7/N1, H7N3; lebend, inaktiviert) eingesetzt wurden, lassen sich wie folgt zusammenfassen: (1.) Nach Infektion/Immunisierung mit schwach pathogenem AIV waren bis zum 9. Tag p.i. bei 100 % der Tiere NA-subtypspezifische Antikörper in hohen Titern nachweisbar, während nach Verabreichung von inaktiviertem Virus bzw. Vakzine erst nach zwei (~ 50 %) bis drei (80 %) Wochen Antikörper auftraten. (2.) Die NA-spezifische Serokonversion nach Belastungsinfektion bei geimpften Hühnern trat frühestens nach vierzehn Tagen (25 %) auf, erreichte maximal 37,5 % der Tiere nach drei Wochen und war umgekehrt proportional zur Intensität der primären Immunantwort nach Immunisierung. (3.) Die nachweisbaren Serumtiter gegen die Belastungsvirus-NA waren gering und häufig an der Nachweisgrenze. Die nachgewiesenen NA-Antikörperprävalenzen liegen bei Zugrundelegung einer 95 %igen Sicherheit und der empfohlenen Untersuchung von zehn Seren je Bestand in einem Bereich, der die sichere Erkennung virusinfizierter Bestände nur unzureichend gewährleistet. Im Ergebnis unserer Untersuchungen sehen wir die NA-subtypspezifische Serologie als alleinige Maßnahme für das Monitoring im Zusammenhang mit einer möglichen Impfung gegen Geflügelpest als problematisch an.

Versuche zur Etablierung eines reversen genetischen Systems für aviäre Influenzaviren

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

Das Ziel der Arbeiten ist es, reverse genetische Systeme für ein gering pathogenes [A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8)] und ein hoch pathogenes [A/chicken/Italy/445/99 (H7N1)] aviäres Influenzavirus zu etablieren. Alle acht Segmente des Genoms (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M, NS) des gering pathogenen Influenza A-Virusstammes A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) wurden mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend in den Polymerase I/Polymerase II-regulierten Transkriptions-Vektor pHW2000 kloniert. Nach Transfektionen in verschiedenen Zellsystemen war es bisher nicht möglich, infektiöses Virus zu generieren. Darüber hinaus wurden die Segmente (PB2, PA, NP, M, NS) des hoch pathogenen Virus amplifiziert und

kloniert. Erste Untersuchungen zur Funktionalität dieser klonierten Segmente wurden durchgeführt.
Mit der Etablierung und Nutzung reverser genetischer Systeme für den schwach pathogenen Influenza A-Virusstamm A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) und den hoch pathogenen Stamm A/chicken/Italy/445/99 (H7N1) erhoffen wir uns detaillierte Einblicke in die molekularbiologischen Vorgänge, die für die Pathogenität und die Wirtsspezifität von Bedeutung sind.

1.9 BIRNAVIREN

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

Letzel, T., Goldmann, K. und Mundt, E.*

Funktionelle Charakterisierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des IBDV

Die Regulation der viralen Replikation des IBDV ist ein Schwerpunkt bei den Untersuchungen zur Biologie der Birnaviren. Dabei steht die virale RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRp, VP1) des IBDV im Mittelpunkt der Untersuchungen, da für dieses Enzym ein *In-vitro*-System zur Transkription viraler RNA etabliert wurde. Für die Untersuchungen wurde das VP1 mittels einer His-Sequenz gereinigt und in den Experimenten eingesetzt. Dabei wurde die höchste RdRp-Aktivität bei Vorhandensein des 3‘-Endes des Segments A bzw. Segments B beobachtet. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in diesen Regionen Sequenzen vorhanden sind, welche wahrscheinlich regulatorisch auf die virale RNA-Synthese einwirken. In weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass nach RNA-Synthese an einem *in vitro* synthetisierten Minusstrang doppelt soviel Reaktionsprodukt vorhanden war wie nach Einsatz eines *in vitro* synthetisierten Plusstrangs. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Plusstrang-Synthese effizienter erfolgte und dies wahrscheinlich auch die *In-vivo*-Situation widerspiegelt.
Das VP1 des IBDV besitzt ein für RdRp ungewöhnliches Motifmuster. Bei den bisher beschriebenen RdRP ist die Reihenfolge der RdRp-Motife A-B-C-D. Beim IBDV befindet sich das RdRp-Motif C vor dem RdRp-Motif A und besitzt darüber hinaus eine ungewöhnliche Aminosäuresequenz. Diese Daten wurden durch Gorbalenya et al. (2002, JBC) mittels Computeranalyse der linearen Sequenz ermittelt. Untersuchungen mit mutagenisiertem und gereinigtem VP1 untermauerten diese Hypothese, da nur bestimmte Mutationen im Motif C toleriert wurden und damit das dem Motif A vorgelagerte Motif C somit wahrscheinlich das enzymatisch aktive RdRp-Motif darstellt. Der Einsatz unterschiedlicher divalenter Kationen im RdRp-Test sowohl mit den mutierten als auch mit dem Wildtypenzym zeigte, dass sich die Polymeraseaktivität nur in Abhängigkeit vom genutzten Enzym veränderte. Interessanterweise wurde bei Einsatz von Kobaltionen die höchste Enzymaktivität festgestellt.

Untersuchungen zur Funktion des VP5 des IBDV

Das VP5 des IBDV ist ein Cystein- und Arginin-reiches Nichtstrukturprotein, das nicht essenziell für die Virusreplikation ist. Eine IBDV-VP5-Deletionsmutante replizierte aber erheblich langsamer in der Zellkultur. Es wurde vermutet, dass es eine Funktion bei der Virusfreisetzung besitzt. Zur Charakterisierung des Proteins wurden zwölf VP5 spezifische monoklonale Antikörper (mAk) charakterisiert. Zur Untersuchung der Funktion des VP5 wurden Cysteine mittels ortsgerichteter Mutagenese substituiert. Zusätzlich dazu wurde eine vermutete Membrandomäne in ihren hydrophoben Eigenschaften verändert. Bei den durchgeführten Substitutionen wurde die Aminosäuresequenz des überlappenden Leserahmens des Polyproteins nicht verändert. Die Charakterisierung des mittels der reversen Genetik generierten IBDV zeigte, dass die Mutante mit der veränderten Membrandomäne keinen signifikanten Unterschied während der Replikation in der Zellkultur im Vergleich zum Wildtypvirus aufwies. Das veränderte VP5 war auf der Zellmembran zu beobachten und besitzt

somit sehr wahrscheinlich keine Transmembrandomäne. In zusätzlichen Experimenten wurde dieser Befund erhärtet, da nach Einsatz von Brefeldin A beobachtet wurde, dass das VP5 auf der Zellmembran nicht fixierter Zellen vorhanden war. Interessanterweise resultierte aber die Veränderung bestimmter Cysteine in einen Phänotyp, der dem des IBDV-VP5-Minus entsprach. Bei diesen VP5-Mutanten war kein VP5 auf der Zellmembran nicht fixierter Zellen zu beobachten. Diese Untersuchungen sollen fortgesetzt werden, um den Mechanismus des Transports des VP5 auf die Zellmembran zu klären.

1.10 REOVIREN

1.10.1 Aviäre Rotaviren

Nachweis von atypischen Rotaviren beim Geflügel (Broilerküken)
Elschner, M., Grund, C., Löhren, U., Otto, P.* und Reetz, J.

Rotaviren bilden eine eigene Gattung innerhalb der Familie Reoviridae. Mit serologischen und zunehmend molekularen Methoden werden Rotaviren (RV) entsprechend ihres gruppenspezifischen Antigens in die Gruppen A bis G eingeteilt.
Die RV der Gruppe A, auch als "typische Rotaviren" bezeichnet, haben zurzeit als Durchfallerreger bei jungen Tieren und beim Menschen die größte Bedeutung. RV anderer Gruppen, die so genannten "atypischen Rotaviren", kommen ebenfalls als Durchfallerreger bei Tieren und Menschen vor, jedoch weitaus seltener als RV der Gruppe A. Bei verschiedenen Geflügelarten wurden bisher insbesondere die Vertreter der Gruppe D nachgewiesen.
Zum Nachweis und zur Charakterisierung von RV wendeten wir zwei unterschiedliche molekulare Techniken an: eine semi-nested Reverse Transkription (RT)-PCR zum Nachweis von RV der Gruppe A und die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), die eine Unterscheidung der RV in Gruppen zulässt und somit auch atypische RV bzw. RV aller Gruppen erfasst. Zur Untersuchung gelangte Kot oder Darminhalt von 132 an Durchfall bzw. MAS erkrankten Hühnerküken überwiegend in einem Alter von ca. einer Woche aus 34 Beständen Nord- und Süddeutschlands. Teilweise wurden die Proben mehrerer Tiere gepoolt.
RV der Gruppe A konnten wir mittels PCR bei 45 Tieren nachweisen. In der PAGE konnten diese Befunde nur in fünf Fällen bestätigt werden, was wir auf einen äußerst geringen Virustiter und somit auf eine geringe Virusausscheidung zurückführten.
Andererseits gelang mit dieser Methode die Detektion atypischer RV bei 50 Tieren, die aus 22 von 34 Beständen stammten. Der vorliegende Elektropherotyp entsprach in 39 Fällen der Gruppe D und in acht Fällen der Gruppe F. Bei drei weiteren Tieren könnte es sich um RV der Gruppe G oder einer bisher noch nicht nachgewiesenen Gruppe handeln. Offensichtlich wurden die in der PAGE bzw. im Elektronenmikroskop nachgewiesenen Viren mit einem Titer von mind. 10^5/ml von den erkrankten Tieren ausgeschieden.

Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung eines aviären Rotavirusisolates der Gruppe A
Elschner, M.*, Hotzel, H., Reetz, J., Diller, R., Prudlo, J. und Otto, P.

Im Darminhalt eines 35 Tage alten kümmernden Broilerkükens wurden elektronenmikroskopisch Rotaviruspartikel nachgewiesen. Das Rotavirus (02V0002G3) wurde auf MA-104 Zellen isoliert und zeigte 48 Stunden p.i. einen Rotavirus-typischen zytopathischen Effekt mit Bildung von Sichelzellen und Granulierung. Mittels Polyacrylamidgelelektrophorese konnte

ein typisches RNA-Muster für Gruppe A (gpA) Rotaviren festgestellt werden. Nach Amplifizierung und Sequenzierung des für das innere Kapsidprotein kodierenden Gensegmentes 6 (VP6) konnte lediglich ein geringer Grad an Homologie in Nukleotid- und Aminosäuresequenz (66,9 bis 69,7 % und 70,3 bis 72,8 %) im Vergleich zu gpA Rotaviren von Säugetieren nachgewiesen werden. Zu den aviären gpA Rotavirusisolaten Ty-1, Ty-3, Po-13, und RK3 besteht eine Homologie von 76,6 - 79,5 % und 86,4 - 87,7 % in Nukleotid- und Aminosäuresequenz. Eine besonders enge Verwandschaft liegt zum VP6 des aviären Isolates Ch-1 vor (99,2 % Aminosäuresequenzhomologie), welches bisher keinem anderen aviären Isolat zugeordnet werden konnte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass offensichtlich aviäre Rotaviren unterschiedlicher VP6 Typen vorkommen.

1.11 RETROVIREN

1.11.1 Virus der bovinen enzootischen Leukose (BLV)

Beier, D.*, Geue, L. und Teifke, J.P.
(teilweise in Zusammenarbeit mit Bondzio, A. und Gabler, C., Freie Universität Berlin)

Unsere Langzeituntersuchungen zum Auftreten, zur Persistenz und zum möglichen Einfluss von BLV-Subtypen auf die Pathogenese und Diagnostik der enzootischen Rinderleukose wurden fortgeführt. Untersuchungen mit Probenmaterial unserer Versuchstiere und leukosepositiver Rinder aus der Praxis bestätigte die Dominanz des Subtyps „Belgien“ in Deutschland. In wenigen Fällen wurde aber auch der Subtyp „Australien“ nachgewiesen. Aus einer Feldprobe konnte im abgelaufenen Berichtszeitraum ein bisher nicht beschriebener BLV-Provirussubtyp bei zwei Rindern einer Herde amplifiziert werden. 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 weitergeführt werden. Im Ergebnis dieses Langzeitversuches werden neue Erkenntnisse zur Pathogenese sowie zum tumorösen Endstadium der Erkrankung gesammelt.

Untersuchungen zur Regulation der BLV-Expression

Die BLV-Infektion ist durch eine lange Latenzperiode gekennzeichnet, gefolgt durch die Entwicklung einer persistierenden Lymphozytose. Da die Hauptzielzelle für das BLV der B-Lymphozyt ist, sollte die Virusexpression durch B-Zellaktivatoren beeinflussbar sein. Wir fanden, dass LPS die Expression der viralen Antigene gp51 und p24 in bovinen PBMC steigert. Ziel unserer Untersuchungen war die Identifizierung der Signaltransduktionswege, die die LPS-induzierte Aktivierung der BLV-Expression vermittelt. Mittels RT-PCR wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung der Virusexpression durch LPS über den Toll-like Rezeptor 4 erfolgt, da ein signifikanter zeitabhängiger Anstieg der TLR-4 spezifischen mRNA in Lymphozyten nach LPS-Stimulation entdeckt wurde. LPS steigert außerdem die NF-κB Expression und die IL-8 Sekretion. Die LPS-Stimulation führte auch zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS). Dies gibt einen weiteren Hinweis auf die mögliche Rolle der ROS bei der Regulation der Virusexpression.

1.11.2 Virus der Caprinen Arthritis-Encephalitis (CAE)

Beier, D.* und Junghans, D.

Im Rahmen der Aufgabenstellung konzentrieren sich unsere Untersuchungen auf die

Abklärung nicht eindeutiger serologischer Befunde aus der Routinediagnostik. Mit Hilfe serologischer Antikörpernachweise wurden in Amtshilfe Untersuchungen bei Verdacht auf eine Infektion mit CAEV durchgeführt. Ein Sortiment von Referenzseren, die von eigenen Versuchstieren (Schafen und Ziegen) mit bekanntem Krankheitsverlauf gewonnen wurden, steht zur Überprüfung der diagnostischen Kits bereit.

1.11.3 Enzootisches Nasentumorvirus (ENTV)

Pathomorphologische und molekularpathologische Untersuchungen zum enzootischen Ethmoidalkarzinom des Schafes

Teifke, J.P.*, Klopfleisch, R., Riebe, R., Vahlenkamp, T.W. und Beier, D. (in Zusammenarbeit mit Barros, S. S. [Department of Pathology, Veterinary Faculty, Federal University of Pelotas, Brasilien] und Driemeier, D. [Department of Pathology, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasilien])

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 „enzootic nasal tumor virus“ (ENTV-1) angesehen, einem mit dem „Jaagsiekte sheep retrovirus“ (JSRV) und endogenen ovinen retroviralen Sequenzen (ovERVs) auf Genomebene eng verwandten β-Retrovirus.
Hinsichtlich der viralen Onkogenese ist bekannt, dass das Env-Protein 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 rezeptorassoziierte Tyrosinkinase RON stimuliert wird. Durch *In-vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass Env-Protein ebenfalls Fibroblasten transformiert. 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, histopathologisch sowie molekular untersucht und primäre Zellkulturen etabliert. Bei der Sektion aller Tiere fanden sich in der Siebbeingegend weiche, graurötliche, blumenkohlartige Tumoren, die in unterschiedlichem Ausmaß die benachbarten Kopfhöhlen oder Kopfknochen infiltrierten und die Nasenmuscheln verdrängten, jedoch nicht metastasierten. Die histopathologische Untersuchung ergab von einem feinen fibrovaskulären Stroma gestützte proliferierende Drüsenepithelien in tubulärer Formation mit stellenweise eingestreuten Lymphozyten und Plasmazellen. In anderen Lokalisationen lagen die Epithelzellverbände in verzweigter, trabekulärer und papillärer Anordnung vor. Zelluläre Atypien fehlten, die Mitosezahl war niedrig, Gefäßeinbrüche waren nicht vorhanden. In einigen Tumoren waren einzelne Nester epithelialer Tumorzellen durch eine stärkere Stromaproliferation auseinandergedrängt, wodurch ein biphasischer Gesamteindruck entstand.
Diese zwei Komponenten fanden sich auch *in vitro*. Einerseits wuchsen in der Primärkultur große epitheloide Zellen, die Drüsenlumina nachahmen und ultrastrukturell durch einen dichten Mikrovillisaum gekennzeichnet sind. Zum anderen traten mesenchymale fibroblastenähnliche Spindelzellen auf, die ein ausgedehntes rER besitzen. In Zellkultur waren keine Viruspartikel nachweisbar.
Die ultrastrukturelle Untersuchung der Tumorzellen erbrachte den Nachweis zytoplasmatischer, elektronendichter, sekretorischer Granula, von ausgedehntem rER und zahlreichen Mitochondrien. Extrazellulär, zwischen den Mikrovilli der Tumorzellen gelegen,

fanden sich zahlreiche runde, 90 bis 100 nm große Partikel retroviraler Morphologie. Mittels einer für die Gag-Region spezifischen PCR in Verbindung mit Restriktionsendonuklease-spaltung und DNA-Sequenzierung wurden in allen fünf ENT sowohl auf Nukleotid- als auch Aminosäureebene für ENTV-1 spezifische Sequenzen nachgewiesen. Im Weiteren wurden Ribosonden synthetisiert und an Paraffinschnitten für die *In-situ*-Hybridisierung angewendet. Genomische RNA und mRNA von ENTV-1 Gag waren mit der antisense T7-Sonde multifokal nesterartig im Zytoplasma zahlreicher epithelialer Tumorzellen sowie interzellulär als kräftige Hybridisierungssignale nachweisbar. Entsprechende Signale waren aber auch in den mesenchymalen Tumorzellen zu beobachten, was die stellenweise ausgeprägte Proliferation der stromalen Anteile erklären dürfte. Korrelierend zu diesen Befunden fanden sich in den Bereichen stärkster Hybridisierungssignale zahlreiche proliferierende, für PCNA positive Tumorzellen. Der immunhistologische Nachweis von phosphoryliertem Akt in diesen Zonen gesteigerter Proliferation spricht zusammen mit einer gleichzeitig verminderten Expression von p53 und p21/CIP1 für eine durch ENTV vermittelte Stimulation des PI3K/Akt-Signalweges.

1.12 POCKENVIREN

1.12.1 Parapockenviren (PPV)

Büttner, M., Planz, O., Rziha, H.-J.*, Schöffler, P. und Stitz, L.

Der neue Orf Virusvektor (ORFV, Genus Parapoxvirus) wurde in den folgenden Teilprojekten weiter untersucht, insbesondere die Induktion einer protektiven Immunabwehr mittels verschiedener Rekombinanten des attenuierten ORFV-Stammes D1701-V.

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 murinen Zellen. Wie berichtet, vermittelt die einzelne oder kombinierte Applikation der ORFV-PrV-Rekombinanten in verschiedenen Mäusestämmen einen soliden Schutz gegen letale PrV-Infektion. Im Rahmen eines EU-Projektes wurden erste Immunisierungsversuche bei Schweinen durchgeführt, die den natürlichen Wirt des PrV darstellen und nicht-permissiv für das ORFV sind. Nach verschiedenen "prime-boost" Vakzinierungsprotokollen, d.h. kombinierten Immunisierungen mit gC- bzw. gD-DNA Plasmiden (sowohl pcDNA- als auch pSindbis DNA-Konstrukte) und mit den ORFV-Rekombinanten, wurden die Tiere einer letalen Belastungsinfektion mit dem virulenten PrV-Stamm NIA3 unterzogen. Es zeigte sich, dass die beste therapeutische Wirkung durch eine booster Immunisierung mit ORFV-PrV Rekombinanten drei Wochen nach Primärvakzination mit Plasmid-DNA erhalten wurde. Alle so vakzinierten Schweine waren ausgezeichnet gegen die Aujeszky'sche Erkrankung geschützt und wiesen eine sehr gute humorale und zell-vermittelte Immunität gegen PrV auf.

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. Wie berichtet, schützte die Immunisierung mit der Rekombinanten D1701-VrVp40, die das Hauptimmunogen p40 des BDV exprimiert, nicht nur komplett gegen die neurologische Erkrankung nach intracranialer Belastungsinfektion, sondern führte auch zu einer Eliminierung des persistierenden BDV aus dem Gehirn der immunisierten Ratten. Laufende Untersuchungen konzentrieren sich v. a. auf die Aufklärung der durch die ORFV-Rekombinante induzierten schnell wirksamen, lang

anhaltenden (bis zu acht Monaten nach Vakzinierung) und eher nicht-entzündlichen lokalen Immunmechanismen. Hierzu wurden semi-quantitative RT-PCR Tests etabliert, die den Nachweis vierzehn verschiedener Cytokine / Interleukine der Ratte erlauben.

Klassisches Schweinepest (CSFV) ORFV Rekombinante

Die Expression des CSFV Glykoproteins E2 durch die ORFV Rekombinante D1701- VrVE2 vermittelt nach einmaliger intramuskulärer Impfung einen soliden Schutz gegen eine letale CSFV-Infektion im Schwein. Ein Abstand von 20 Tagen von der Impfung bis zur CSFV Belastung ist dafür ausreichend, wobei geringe Titer an CSFV-neutralisierenden Serumantikörpern kurz vor der Belastungsinfektion messbar waren. Die Produktion von Interferon-gamma als Parameter der CSFV-spezifischen zellulären Immunreaktion trat kurz nach der Belastungsinfektion in signifikantem Ausmaß auf. Die Bildung CSFV-neutralisierender Antikörper als Antwort auf die Belastungsinfektion war nach einmaliger Impfung mit der ORFV Rekombinanten höher als nach Impfung mit dem CSFV Lebendimpfstoff (Pestiffa).

Molekulare Mechanismen der Attenuierung und des Zelltropismus

ORFV Vektorvakzinen induzieren eine exzellente protektive Immunantwort in Wirten, die für ORFV nicht-permissiv sind. Die Ursachen der fehlenden Virusproduktion in solchen Wirtszellen sind unbekannt. Daher wurden Untersuchungen zum Einfluss der ORFV-Infektion auf intrazelluläre Signalwege begonnen. Es stellte sich heraus, dass die nicht-produktive ORFV-Infektion von Zelllinien der Maus sehr schnell zur Induktion von Apoptose führt, dagegen nicht in permissiven Kulturzellen, die infektiöse Virusnachkommen produzieren. Eine Staurosporin induzierte Apoptose der permissiven Zellen konnte nach ORFV-Infektion gehemmt werden, was auf die Expression anti-apoptotischer Virusfaktoren in permissiven Zellen hinweist. Die Möglichkeit, dass das Auslösen von Apoptose in nicht-permissiven Zellen eine Produktion infektiösen ORFV verhindert, scheint unwahrscheinlich, da z. B. die Inhibition der an der Apoptose beteiligten Caspasen nicht zur Virusproduktion führt. Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Genprodukte des ORFV mit entsprechenden Signalkaskaden der Zelle interagieren und so apoptotisch bzw. anti-apoptotisch wirken.
Die Adaptierung des ORFV an bestimmten Kulturzellen resultiert in einer deutlichen Reduktion der Virulenz unabhängig vom ORFV VEGF-E (vascular endothelial growth factor) Gen. Vergleichende Genomanalysen zweier Zellkultur-adaptierter ORFV-Stämme und Wildtyp-ORFV zeigte die Deletion weiterer Virusgene. Laufende Klonierungen und Expressionsanalysen sollen funktionelle Studien dieser Gene erlauben. Von besonderem Interesse sind hierbei die kürzlich beschriebenen ANK-Gene des ORFV als potenzielle Bindungspartner der NFκB Transkriptionsfaktoren.

Molekulare Differenzierung der Parapockenviren

Die Definition der verschiedenen Spezies des Genus Parapoxvirus ist nicht endgültig geklärt und eine Zuordnung von Virusisolaten aus Wildtieren sowie Rentier und Kamel ist bislang nicht erfolgt. Vergleichende molekulargenetische Untersuchungen, insbesondere die DNA-Sequenzierung des rechten Genomendes ergaben, dass im Gegensatz zu ORFV alle untersuchten Vertreter der Spezies PPV bovis 1 (BPSV) in diesem Genomabschnitt kein nachweisbares VEGF-E Gen enthalten. Kürzlich publizierte DNA-Sequenzendaten zeigten, dass BPSV-Stämme ein neues VEGF-Gen kodieren, das nur geringe Sequenzhomologie zu den beiden bekannten VEGF-E Genen der ORFV besitzt und nicht am rechten, sondern am linken Ende des Virusgenoms kartiert. Die Etablierung einer PCR erlaubt nun den BPSV- und ORFV-VEGF-genspezifischen Nachweis. Der berichtete Nachweis des Interleukin-10 Genhomologs in allen PPV zeigte jetzt, dass definierte Aminosäuresequenzen in diesem Gen eine Unterscheidung zwischen ORFV und BPSV ermöglichen. Der Nachweis des viralen VEGF-E

und Interleukin-10 Gens bietet zwei neue Tests zur Differenzierung der PPV. So waren alle untersuchten PPV-Isolate aus Kamelen genetisch dem BPSV zuzuordnen.

Molekulare und Bioaktivitätsanalyse von Parapockenvirus (PPV)-Isolaten des Menschen
Muschko, K., Voigt, H., Mildner, K., Wienhold, D. und Büttner, M.*

In zehn Fällen humaner Melkerknoten wurde aus Biopsiematerial elektronenmikroskopisch und durch Isolierung in Zellkultur PPV nachgewiesen. Nach *In-vitro*-Vermehrung der Isolate wurde virale DNA präpariert und mittels PCR die kodierenden Bereiche des Haupthüllproteins (42k) und des Interferon-Resistenzgens (E3L Homolog) des ORFV amplifiziert und kloniert. Beide Gene waren im Genom aller Isolate vorhanden. Das KpnI Restriktionsenzym-DNA-Fragmentmuster der Isolate erwies sich als sehr heterogen und war weder dem ORFV (ovines PPV) noch dem BPSV (bovines PPV) eindeutig zuzuordnen. Alle Isolate induzierten eine Interferon-alpha Produktion durch humane periphere mononukleäre Blutleukozyten. Die Stellung der Melkerknoten- oder Pseudokuhpockenviren (PCPV) als eigenständige Spezies im Genus Parapoxvirus ist momentan unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.13 HERPESVIREN

1.13.1 Untersuchungen zur Molekularbiologie animaler Herpesviren

1.13.1.1 Pseudorabies Virus – PrV
Altenschmidt, J., Böttcher, S., Fuchs, W., Gentner, S., Granzow, H., Karger, A., Keil, G., Klopfleisch, R., Klupp, B.G., Kopp, M., Krautwald, M. und Mettenleiter, T.C.*

Ziel der Untersuchungen ist die Aufklärung der Funktionen der ca. 70 verschiedenen viralen Proteine des Alphaherpesvirus Pseudorabies Virus (PrV; Klupp et al., 2004), des Erregers der Aujeszkyschen Krankheit des Schweins. Diese Studien sind nicht nur essenziell für das Verständnis der molekularen Grundlagen der PrV-Infektion, sondern dienen auch als Modell für andere Herpesvirusinfektionen bei Tier und Mensch. Eine solch umfassende Analyse herpesviraler Genprodukte unter weitestgehend standardisierten Versuchsbedingungen ist weltweit einzigartig.

***Untersuchungen zur Funktion des UL17 Proteins*.**
Herpesviren exprimieren eine Vielzahl von Proteinen mit sehr unterschiedlichen Funktionen. Während einige dieser Proteine nur bei einer Unterfamilie vorkommen, gibt es andere, die man bei Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren findet. Diese Proteine besitzen vermutlich eine grundlegende Bedeutung für die Replikation der Herpesviren. Zu den konservierten Genprodukten gehören die zum UL17 des Herpes Simplex Virus (HSV) homologen Proteine. Über die Funktion dieses Proteins ist nur wenig bekannt. Bisher konnte nur für das HSV-1 UL17 gezeigt werden, dass es für die Virusreplikation unbedingt notwendig ist. In Abwesenheit von UL17 werden keine infektiösen Nachkommenviren gebildet, wobei der Defekt bei der Verpackung des viralen Genoms in die Kapside liegt. Fehlt das UL17 Protein, wird die replizierte DNA, die in Form langer Konkatemere gebildet wird, nicht mehr auf Genomlänge zurechtgeschnitten und kann somit auch nicht mehr in Kapside verpackt werden. Über die Lokalisation des Proteins im Viruspartikel finden sich widersprüchliche Aussagen in der Literatur, wobei die Ergebnisse darauf hindeuten, dass das Protein in allen Kapsidformen – Vorläuferkapsid, A-, B-, und C-Typ Kapsid – aber auch im Tegument der Virionen vorhanden

ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass UL17 neben der Rolle bei der DNA Verpackung eine weitere Funktion bei der Freisetzung der Nukleokapside aus dem Kern spielt. Um die Funktion des UL17 Proteins bei PrV zu untersuchen, wurde ein spezifisches Antiserum hergestellt sowie eine UL17-Deletionsmutante und entsprechende trans-komplementierende Zelllinien generiert. Mit dem spezifischen Antiserum konnte PrV UL17 als ca. 64 kDa großes Protein in infizierten Zellen sowie in gereinigten Virionen nachgewiesen werden. Es stellt somit wie bei HSV ein Virusstrukturprotein dar. Über immun-elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Protein vermutlich während der DNA-Verpackung in enger Assoziation mit dem viralen Genom in das vorgefertigte Kapsid gelangt. Im Gegensatz zu HSV konnte es nicht im Tegument nachgewiesen werden und spielt daher bei der primären Umhüllung der Nukleokapside an der inneren Kernmembran vermutlich keine Rolle. Wie bei HSV ist das Protein allerdings für die Spaltung der konkatemeren DNA in Genomlänge und deren Verpackung notwendig. In Abwesenheit von UL17 werden nur unreife Kapside, die nur das Gerüstprotein beinhalten, gebildet. Da die Kapsidmorphogenese und DNA-Verpackung bei den Herpesviren nach einem ähnlichen Mechanismus abläuft wie bei den großen, DNA-haltigen Bakterienviren (Bakteriophagen), soll nun untersucht werden, ob dort funktionshomologe Proteine vorhanden sind. Dies könnte auf einen gemeinsamen Ursprung von Bakteriophagen und Herpesviren hindeuten.

Identifizierung und Charakterisierung der UL4 und UL7 Genprodukte

Da über die Funktionen des bei Alphaherpesviren konservierten UL4 Gens und des bei Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren konservierten UL7 Gens bislang nur wenig bekannt war, wurden entsprechende PrV-Deletionsmutanten hergestellt und *in vitro* charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass beide Gene für die Virusreplikation in Zellkultur nicht essenziell sind. Während die Deletion von UL4 nur geringfügige Auswirkungen auf die Virusvermehrung hatte, zeigte UL7-negatives PrV gegenüber dem Wildtypvirus und einer UL7-Revertante um etwa 90 % reduzierte Virustiter und um 60 % verringerte Plaquedurchmesser. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass in Abwesenheit von UL7 die sekundäre Umhüllung von Nukleokapsiden im Cytoplasma und die Freisetzung reifer Viruspartikel weniger effizient erfolgen. Analog zu diesen *In-vitro*-Replikationsdefekten von UL7-negativem PrV wurde in experimentell infizierten Mäusen eine im Vergleich zum Wildtypvirus verlangsamte Neuroinvasion festgestellt. Mit Hilfe gegen bakterielle Fusionsproteine gerichteter monospezifischer Antiseren konnten die UL4 und UL7 Genprodukte im Zytoplasma PrV-infizierter Zellen als 16 bzw. 29 kDa große Proteine identifiziert werden. Im Gegensatz zum UL4 Genprodukt war das UL7 Protein auch in gereinigten Virionen nachweisbar, wo es vermutlich eine Komponente des Teguments darstellt.

Untersuchungen zur Funktion der UL41-homologen Proteine der Alphaherpesviren

Die Existenz eines zum UL41 von HSV homologen Gens in allen bisher untersuchten Alphaherpesviren weist auf eine wichtige Funktion des entsprechenden Genproduktes, des virion host shutoff (vhs) proteins, bei der Replikation dieser Viren hin. Das vhs Protein ist Bestandteil des Virions und bildet zusammen mit dem eukaryontischen Translationsinitiations-faktor eIF4H ein ribonukleolytisches Enzym, das den Abbau von RNA, präferenziell 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 (erhalten von D. Leib, St. Louis, USA). Die Untersuchung der Proteinbiosynthese einiger hundert Proteine durch metabolische Markierung mit radioaktiven Aminosäuren und anschließende Analyse durch 2D-Elektophorese und quantitative Radioluminographie ergab, dass nach Infektion von HeLa

(HSV-1, PrV) und MDBK (BHV-1, PrV) Zellen mit allen untersuchten Viren ein effizienter shutoff etabliert werden konnte, unabhängig vom vhs Protein. Allerdings war dieser nach Infektion mit der UL41-negativen BHV-1 Mutante im Vergleich zum Wildtyp BHV-1 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 Proteinspiegel einer größeren Anzahl ausgewählter Proteine nach Infektion von HeLa Zellen mit PrV und HSV-1 gemessen werden. Trotz des oben geschilderten ‚virion host shutoff' erwiesen sich die meisten 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. Die einzige signifikante Ausnahme war eine Isoform des Hitzeschock-Proteins 27 (HSP27), die nach Infektion mit PrV oder HSV-1 auf 30 bis 40 % des Ausgangwertes fiel. Es soll nun weiter untersucht werden, welches virale Protein den shutoff in Abwesenheit des UL41 hervorruft, wie die Proteinpegel in infizierten Zellen trotz stockender Neusynthese aufrecht erhalten werden können, welche Bedeutung der Abfall des HSP27 für die Virusinfektion hat und wie sich die bis zu 15 anderen Isoformen des HSP27 nach der Infektion verändern. Ziel dieser Untersuchungen ist ein genaueres Verständnis der Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle auf der molekularen Ebene.

1.13.1.2 Koi Herpesvirus (KHV)

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

Klonierung des KHV-Genoms und Identifizierung immunogener Virusproteine

Seit einigen Jahren tritt in Koi- und Karpfenzuchtbetrieben Asiens, Europas und Amerikas immer häufiger eine meist tödlich verlaufende Infektionskrankheit auf, als deren Erreger ein vorher nicht bekanntes Herpesvirus (KHV) identifiziert wurde (siehe Übersichtsartikel ???). Das doppelsträngige DNA-Genom des KHV ist vermutlich über 290 kbp groß; bislang wurden allerdings nur die DNA-Sequenzen weniger kurzer Genomabschnitte veröffentlicht. Als Voraussetzung für eine genauere Charakterisierung wurde aus infizierten Karpfenzellkulturen genomische KHV-DNA isoliert, durch Restriktions-Endonukleasen oder mechanische Scherung fragmentiert und über verschiedene Vektoren in E. coli kloniert. Auf diese Weise wurden bisher Plasmidklone von etwa achtzig 0,5 – 8 kbp großen, Cosmidklone von etwa einhundert 40 – 50 kbp großen und eine Lambda-Phagen Bibliothek von ca. 5×10^4 0,8 – 1,5 kbp großen Genomfragmenten des KHV erhalten, die zusammen genommen das gesamte Virusgenom in überlappenden bzw. redundanten Teilen repräsentieren dürften. Bei Bedarf können diese Klone zur Ermittlung oder Überprüfung von DNA-Sequenzen des KHV-Genoms eingesetzt werden. Darüber hinaus erlauben die hergestellten Lambda-Phagen eine Expression der klonierten Gene in Bakterien und können so zur Identifizierung der Zielproteine KHV-spezifischer Antikörper eingesetzt werden. Mit Hilfe der Lambda-Phagen Bibliothek sollen sowohl die verfügbaren monoklonalen Antikörper (siehe ???), als auch die Seren KHV-infizierter Fische untersucht werden, um Aufschluss drüber zu erhalten, welche viralen Genprodukte für diagnostische Tests oder als Impfstoffe geeignet sein könnten.

Ein möglicherweise immunogenes Membranprotein des KHV konnte bereits aus einer veröffentlichten viralen DNA-Sequenz abgeleitet werden. Das entsprechende Gen wurde in ein Plasmid kloniert, das die Expression des Proteins in transfizierten eukaryontischen Zellen erlaubte. Das Expressionsprodukt konnte durch Western Blot Analysen mit einem experimentell hergestellten KHV-spezifischen Kaninchenantiserum identifiziert werden und

auch in KHV-infizierten Zellen war ein virales Protein gleicher Größe nachweisbar. Es bleibt zu prüfen, ob dieses KHV-Protein auch für die Immunantwort im Karpfen relevant ist.

Herstellung rekombinanter Koi Herpesviren

Gentechnisch hergestellte, rekombinante Herpesviren sind wichtige Hilfsmittel bei der funktionellen Charakterisierung viraler Gene und Replikationsmechanismen. Darüber hinaus sind solche Viren häufig auch als Lebendvakzinen geeignet. Um die Möglichkeit der Herstellung entsprechender KHV-Rekombinanten zu prüfen, wurde zunächst eine Expressionskassette für das grün fluoreszierende Protein (GFP) so in ein kloniertes KHV-Genomfragment inseriert, dass auf beiden Seiten ausreichende virale DNA-Sequenzen für eine homologe Rekombination mit KHV-Genom erhalten blieben. Als Insertionsort wurde das beschriebene Gen der viralen Thymidinkinase gewählt, da die dazu homologen Gene aller anderen bislang untersuchten Herpesviren für die Replikation in Zellkultur entbehrlich sind. Mit dem erhaltenen Plasmid wurden Karpfenzellkulturen transfiziert und anschließend mit KHV infiziert. Die Expression des GFP-Reporterproteins erlaubte die Identifizierung rekombinanter Virusnachkommen durch Fluoreszenzmikroskopie infizierter Zellen. Nach Vereinzelung grün fluoreszierender Plaques wurden phänotypisch homogene Virusmutanten erhalten, deren Genomstruktur und biologische Eigenschaften zurzeit untersucht werden. Um die Herstellung rekombinanter Koi-Herpesviren weiter zu vereinfachen, soll versucht werden das vollständige KHV-Genom, ähnlich wie schon für PrV geschehen (siehe Jahresbericht 2000, S. 53-55), als artifizielles Bakterienchromosom zu klonieren. Nach erfolgreicher Mutagenese in E. coli könnten die gewünschten KHV-Rekombinanten dann unmittelbar durch Transfektion von Karpfenzellen gewonnen werden.

1.13.2 Aufdeckung der molekularen Mechanismen der Infektionsinitiation bei Herpesviren

Altenschmidt, J., Fuchs, W., Granzow, H., Krautwald, M., Klupp, B.G. und Mettenleiter, T.C.

Rolle viraler Glykoproteine bei der Membranfusion

Herpesviren gelangen durch Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran in die Wirtszelle. An diesem als Penetration bezeichneten Prozess sind virale Glykoproteine essenziell beteiligt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass gD, gB und der gH/gL-Komplex für die Wildtyp-Infektion unabdingbar sind. Durch „erzwungene Evolution in Zellkultur“, d. h. durch wiederholte Passagen von gL-negativen Viren, die noch zu einer minimalen Ausbreitung von infizierten in benachbarte nicht infizierte Zellen befähigt sind, gelang die Isolierung von Viren, die auch in Abwesenheit von gL infektiös sind (gL-unabhängige Infektiosität). In allen aus bisher drei unabhängigen Passagen erhaltenen Virusmutanten konnten Veränderungen im gH nachgewiesen werden, die zumindest zum Teil für die auftretende Infektiosität verantwortlich sind. Neuere Untersuchungen deuten nun darauf hin, dass auch Veränderungen im gB für die gL-unabhängige Infektion eine Rolle spielen. In *In-vitro*-Fusionsassays soll nun der Einfluss der veränderten gH und gB Proteine weiter untersucht werden. Mit Hilfe dieser *In-vitro*-Fusionsassays konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass nicht nur Fusions-fördernde, sondern auch Fusions-hemmende bzw. modulierende Proteine während der PrV-Infektion gebildet werden. Das Glykoprotein M, das ein mehrfach membranverankertes Typ III Membranprotein darstellt, verhindert die Fusion. Weitere Typ III Membranproteine sind pUL43, gK und auch pUL20. Während pUL43 wie gM die Fusion von gB und gH exprimierenden Zellen hemmt, braucht gK seinen Komplexpartner pUL20 für einen ähnlichen Effekt. Eine Mutante, der drei dieser Proteine, nämlich gK, gM und pUL43 fehlen, zeigte

allerdings in der Zellkultur keine erhöhte Fusogenität, was auf die Anwesenheit weiterer Fusionsregulatoren hindeutet.

Funktion viraler Tegumentproteine bei der Infektionsinitiation

Herpesviren infizieren ihre Wirtszellen hauptsächlich durch eine pH-unabhängige Fusion der Virushülle mit der Zytoplasmamembran. Nachdem die Membranen miteinander verschmolzen sind, gelangen das Nukleokapsid und die Tegumentproteine in die Zelle, während die Hüllproteine an der Zelloberfläche verbleiben. Während ein Teil der Tegumentproteine rasch vom Kapsid abfällt, wird das Nukleokapsid mit einzelnen anhaftenden Tegumentproteinen entlang der Mikrotubuli zur Kernpore transportiert, wo die virale DNA in den Kern freigesetzt wird und die Virusreplikation beginnen kann. Unklar ist im Moment noch, welche Tegumentproteine nach Eintritt in die Zelle freigesetzt werden und welche am Nukleokapsid verbleiben. Interessant sind dabei die Tegumentproteine, die am Nukleokapsid haften bleiben, denn sie kommen als mögliche Kandidaten für die Interaktion mit den Motorproteinen der Mikrotubuli bzw. als Adapter in Betracht.
Durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen gelang es uns nun nachzuweisen, dass die Kapsid-assoziierten Tegumentproteine UL36, UL37 und US3 mit dem Kapsid zur Kernpore transportiert werden, während Haupttegumentproteine wie UL46, UL47, UL48 und UL49 nach dem Eintritt in die Zelle rasch verloren gehen und somit als Interaktionspartner für die Mikrotubuli nicht in Frage kommen. Mit Hilfe des Hefe „Two-Hybrid-Systems“ sollen nun mögliche zelluläre Interaktionspartner für UL36 und UL37 identifiziert werden.

1.13.3 Untersuchungen der Funktionen viraler Proteine bei Morphogenese und Freisetzung von Herpesviren

Böttcher, S., Gentner, S., Granzow, H., Karger, A., Mettenleiter, T.C.*, Michael, K. und Wiesner, D.

Funktion und Interaktion zwischen PrV Proteinen bei der Virusmorphogenese

Während der Herpesvirusmorphogenese müssen mehr als 30 verschiedene virale Proteine zu einem kompletten infektiösen Partikel zusammengefügt werden. Der Kapsidzusammenbau und die Verpackung der DNA erfolgt dabei im Kern infizierter Zellen, während die Anlagerung von Tegument und die Umhüllung im Zytoplasma stattfinden. Die Koordination des Zusammenbaus scheint über Protein-Protein-Interaktionen der einzelnen Komponenten zu erfolgen. Im Rahmen des Projektes sollen die verschiedenen Wechselwirkungen untersucht werden.
Im Berichtszeitraum gelang es uns, eine bisher unbekannte Interaktion der UL16 und UL21 Proteine aufzudecken. Antiseren gegen das UL16 Protein präzipitierten gleichzeitig das UL21 Protein und umgekehrt. Für HSV konnte für UL16 ein anderer Interaktionspartner, nämlich das UL11 als Komplexpartner identifiziert werden. UL21, UL16 und UL11 sind bei Herpesviren der Säuger und Vögel konserviert, was wiederum auf eine wichtige Funktion während der Replikation und auf die Anwesenheit eines funktionellen heterooligomeren Komplexes aus UL16, UL21 und UL11 hindeutet. Mutanten, denen eines, zwei oder alle drei Proteine fehlen, sind allerdings immer noch in der Lage, sich in der Zellkultur zu vermehren, zeigen aber in elektronenmikroskopischen Untersuchungen Behinderungen bei der sekundären Umhüllung im Zytoplasma.
Ein weiteres konserviertes Tegumentprotein stellt das pUL51 dar. Auch über dessen Funktion ist wenig bekannt. Eine PrV UL51-Deletionsmutante repliziert zu nur unwesentlich reduzierten Titern im Vergleich zum Wildtyp und zeigt auch nur geringfügige Beeinträchtigungen der sekundären Umhüllung im Zytoplasma. Auch hier liegt die Annahme nahe, dass weitere virale Proteine existieren, die das Fehlen des konservierten Proteins ausgleichen können. Das UL11

Protein zeigt von der Struktur her einige Gemeinsamkeiten mit dem pUL51: es sind relativ kleine, konservierte Proteine, die vermutlich wahrscheinlich durch Anheften von Fettsäuren modifiziert und im Bereich des Golgi Apparates zu finden sind. Aber auch hier zeigte eine UL11/UL51-Doppelmutante keinen über den Defekt des UL11 hinausgehenden Effekt.

Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen bei Strukturproteinen des PrV

Grundlegende Erkenntnisse zum Ablauf von Virusinfektionen und zur Funktion viraler Proteine können durch die Identifizierung viraler oder zellulärer Komponenten gewonnen werden, die mit diesen Virusproteinen interagieren. Die physikalischen Interaktionen von Viruskomponenten werden in sogenannten ‚pull down' Versuchen untersucht, bei denen die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine exprimiert und an eine feste Matrix gebunden werden. Nach der Bindung von spezifischen Liganden werden diese eluiert und anschließend massenspektrometrisch identifiziert. So wurden die Produkte des UL1, UL3, UL4, UL7, UL11, UL14, UL16, UL17, UL21, UL24, UL31, UL41, UL46 und UL47 Gens als Glutathion S-Transferase (GST) Fusionsproteine exprimiert, gereinigt und auf ihre Eignung für ‚pull down' Versuche geprüft. Bei der Auswahl der zu untersuchenden Genprodukte wurde ein Schwerpunkt auf Bestandteile des Teguments gelegt, welches Viruskapsid und Virushülle verbindet. Aufgrund mangelnder Löslichkeit der meisten GST-Fusionsproteine wurden die Leseraster des UL16, UL21, UL41, UL46, UL47 und UL48 auch als ‚maltose binding protein' (MBP) Fusionsproteine exprimiert und gereinigt. Diese erwiesen sich in der Regel als besser geeignet als die weitläufig verwendeten GST Fusionsproteine.

2D-elektrophoretische Kartierung und Quantifizierung der Strukturproteine des PrV

Hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese in Kombination mit massenspektrometrischer Identifizierung von Proteinen erlaubt die Analyse von Virusstrukturkomponenten einschließlich des Nachweises von Proteinmodifikationen und von Strukturproteinen nicht-viraler Herkunft. Von den ca. 30 Strukturproteinen des PrV konnten 19 nach ein- oder zweidimensionaler Gelelektrophorese hoch gereinigter Virionen massenanalytisch identifiziert werden. Eine Reihe von Strukturproteinen wurde in mehreren Ladungsmodifikationen vorgefunden, deren Bedeutung unklar ist. Ebenfalls noch nicht beschrieben ist ein verkürztes Prozessierungsprodukt des Hauptkapsidproteins von ca. 65 kDa, das neben dem erwarteten Produkt von 142 kDa in drei verschiedenen Ladungsmodifikationen vorliegt. Komponenten zellulärer Herkunft (Aktin, Annexin I, Annexin II, Vimentin, HSP70 und HSC70) konnten ebenfalls als Virusbestandteile nachgewiesen werden.

Durch Anwendung von stabilen Isotopen zur metabolischen Markierung können Virusstrukturproteine in Virionen massenanalytisch quantifiziert werden. Dies spielt vor allem bei der Charakterisierung von Virusmutanten eine Rolle, da das Konzept zur funktionellen Charakterisierung viraler Gene durch Isolierung von Deletionsmutanten voraussetzt, dass nicht deletierte Proteine in gleicher Weise wie im Wildtyp exprimiert, modifiziert und – bei Strukturproteinen – auch in das Virion eingebaut werden. Untersucht wurden Deletionsmutanten des UL41, UL46 und UL47. So führte die Deletion des UL41, das selbst nur eine minore Komponente des Teguments darstellt, zu einem auffälligen Mangel an den Tegumentproteinen UL47 und UL49. Verschiebungen gab es ebenfalls in der UL47 Mutante, in deren Viruspartikeln das US2 und das vollständige UL48 akkumulieren, während die Mengen eines ebenfalls bis dato nicht bekannten verkürzten Prozessierungsproduktes des UL48 verringert sind.

Identifizierung der UL31 und US4 (gG) Genprodukte von ILTV

Die infektiöse Laryngotracheitis ist eine von einem Alphaherpesvirus (Infectious Laryngotracheitis Virus - ILTV) hervorgerufene Atemwegserkrankung der Hühner, die weltweit verbreitet ist. Bislang konnten wir mit Hilfe monoklonaler Antikörper und

monospezifischer Antiseren 17 verschiedene Proteine des ILTV nachweisen. Bei sieben davon handelt es sich um ILTV-spezifische Genprodukte, die keine signifikanten Homologien zu Proteinen anderer Herpesviren aufweisen. Daneben wurden die Produkte von zehn gegenüber anderen Herpesviren konservierten Genen identifiziert. Diese codieren für glykosylierte und nicht glykosylierte Membranproteine der äußeren Virushülle (UL10, UL22 = gH, UL44 = gC, UL49.5 = gN, US5 = gJ), und für Komponenten des Teguments, das zwischen Nukleokapsid und Hüllmembran der Virionen eingelagert ist (UL37, UL46, UL47, UL48, UL49).
Im letzten Jahr wurden mit UL31, UL34 und US4 drei weitere konservierte Leseraster des ILTV-Genoms als bakterielle Fusionsproteine exprimiert und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Obwohl alle erhaltenen Antiseren in Western Blot Analysen deutliche Reaktionen mit den jeweiligen Fusionsproteinen zeigten, konnte das virale UL34 Genprodukt weder in ILTV-infizierten Hühnerzellen noch in gereinigten Virionen detektiert werden, was auf eine geringe Expression oder Antigenität des viralen UL34 Proteins hindeutet. Das etwa 32 kDa große UL31 Genprodukt von ILTV war nur in infizierten Zellen nachweisbar, nicht aber in gereinigten Virionen. Vermutlich ist dieses Protein wie die homologen UL31 Genprodukte anderer Herpesviren nur an den ersten Schritten der Virusfreisetzung beteiligt, nämlich dem Transport der im Zellkern gebildeten Nukleokapside durch die Kernmembran.
Auch das US4 Genprodukt von ILTV wird wie die entsprechenden Glykoproteine (gG) einiger anderer Alphaherpesviren nicht in reife Viruspartikel eingebaut, sondern als lösliches Protein aus infizierten Zellen freigesetzt. Da die in ILTV-infizierten Zellen und im Zellkulturüberstand nachweisbaren US4-Genprodukte mit 50-80 kDa deutlich größer erscheinen als aus der Aminosäuresequenz berechnet wird (31,7 kDa), liegt eine post-translationale Modifikation des Proteins durch N- und/oder O-Glykosylierung nahe. Die genaue Art dieser Modifikationen wird derzeit mit Hilfe verschiedener Glykosidasen und Hemmstoffe der Glykosylierung aufgeklärt. Weiterhin soll untersucht werden, ob und in welchem Umfang die Seren natürlich und experimentell ILTV-infizierter Hühner Antikörper gegen das offensichtlich abundant exprimierte und sezernierte gG enthalten. Falls solche Antikörper durch Wildtyp-Viren reproduzierbar induziert werden sollten, könnten die verfügbaren gG-negativen ILTV-Rekombinanten ähnlich wie gJ-negative Mutanten als mögliche Marker-Vakzinen für ein DIVA-Immmunisierungsprogramm geeignet sein.

1.13.4. Untersuchung der Bedeutung viraler Proteine für die Neuroinvasion durch Herpesviren

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

Eine Vielzahl von Alphaherpesviren zeigt einen ausgeprägten Neurotropismus. Die Infektion peripherer Ganglienzellen setzt einen retrograden Transport des Herpesviruskapsids mit anhängenden Tegumentproteinen zum Zellkern voraus, der über zelluläre Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine vermittelt wird. Vom Perikaryon ausgehend werden nach erfolgter Replikation Virusnachkommen anterograd zurück in die Peripherie oder zentral zu synaptisch verbundenen Neuronen transportiert. Bisher ist noch nichts über die viralen Strukturelemente bekannt, die den Kontakt zu den zellulären Motorproteinen aufnehmen. Zur Visualisierung des intraneuronalen Transports von PrV-Kapsiden wurde eine primäre murine trigeminale Ganglienzellkultur etabliert. Diese wurde mit unterschiedlichen Pseudorabiesviren (PrV-Kaplan, PrV-ΔUL11, PrV-ΔUL37, PrV-ΔUL48, PrV-ΔgE, PrV-ΔUS9) infiziert, die durch Fusion des EGFP-Gens mit dem UL35-Leseraster grün autofluoreszierende Kapside bilden. Mittels Zeitrafferaufnahmen am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop konnte ein schneller bidirektionaler intraaxonaler Transport der Kapside dargestellt werden. Erste Untersuchungen ergaben einen anterograden Nettotransport mit höheren Geschwindigkeiten und längeren unterbrechungsfrei zurückgelegten Strecken. Im Gegensatz zu den anderen Mutanten zeigte PrV-ΔUL37 in unserem Modell einen vollständigen Defekt im axonalen Transport. Obwohl die

phänotypisch komplementierten Virionen Neuronen infizierten, konnten zu keinem Zeitpunkt bewegliche Kapside nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine Rolle des UL37 Tegumentproteins beim Transport viraler Kapside im Axon schließen.

1.13.5 Vergleichende molekularbiologische Charakterisierung von PrV Isolaten vom Schwarzwild

Müller, T.*, Teuffert, J., Klupp, B.G. und Conraths, F.J.

PrV-Infektionen können in Schwarzwildbeständen Deutschlands sporadisch nachgewiesen werden, wobei es epidemiologische Anhaltspunkte für eine Ausbreitung in der Schwarzwild-population gibt. Die Charakterisierung europäischer PrV-Isolate vom Schwarzwild mittels Sequenzierung eines ca. 600 bp langen Fragmentes des für das Glykoprotein C kodierenden Genomabschnittes des PrV wurde abgeschlossen. Die phylogenetischen Analysen lassen eine eindeutige epidemiologische und geographische Unterscheidung der PrV-Isolate innerhalb Europas zu. Die Sequenzierung des für das Glycoprotein C kodierenden Genomabschnittes des PrV scheint für die molekularepidemiologische Charakterisierung weitaus bessere Informationen als die konventionelle Restriktionsfragmentanalyse zu liefern.

Weitere Projekte

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

Kinetik PrV-spezifischer maternaler Antikörper beim Schwarzwild
Müller, T.*, Teuffert, J. und Conraths, F.J.

Sensitivitätsvergleich verschiedener PrV-spezifischer PCRs für die Routinediagnostik
Müller, T.*, Rhiza H.-J. und Conraths, F.J.

1.13.6 Entwicklung verbesserter Impfstoffe gegen ILTV

Wiesner, D., Veits, J., Teifke, J.P. und Fuchs, W.

In-vitro- und In-vivo-Charakterisierung rekombinanter ILT-Viren mit Deletionen der UL47, gG und gJ Gene

Die infektiöse Laryngotracheitis (ILT) ist eine wirtschaftlich bedeutende Atemwegserkrankung der Hühner, die Wachstum und Legeleistung beeinträchtigt und abhängig von der Virulenz des Erregers in 5 – 70 % der Fälle tödlich verläuft. Die ILT wird durch ein weltweit vorkommendes Alphaherpesvirus (ILTV, gallid herpesvirus 1) verursacht, zu dessen Bekämpfung die Tiere prophylaktisch mit abgeschwächten Virusisolaten immunisiert werden können. Allerdings sind die bislang eingesetzten Lebendvakzinen genetisch nicht charakterisiert und weisen häufig eine signifikante Restvirulenz auf, die sich während der Tierpassage weiter steigern und zur Erkrankung der geimpften Hühner oder nicht immunisierter Kontakttiere führen kann. Außerdem lassen sich die abgeschwächten Impfviren mittels diagnostischer und molekularbiologischer Methoden nicht von pathogenen ILTV-Stämmen unterscheiden. Ebenso ist bei ILTV bislang keine serologische Differenzierung geimpfter und infizierter Individuen möglich, wie sie zur Kontrolle anderer tierpathogener Viren (z. B. PrV, BHV-1) erfolgreich eingesetzt wird.

Im Hinblick auf die Entwicklung verbesserter Lebendvakzinen haben wir in den letzten Jahren zahlreiche rekombinante ILT-Viren hergestellt, aus deren Genomen verschiedene für die Replikation in Zellkultur nicht essenzielle Gene entfernt worden waren. In jüngster Zeit wurden ILTV-Mutanten charakterisiert, die Deletionen in drei benachbarten Genen aufweisen, die für ein Tegumentprotein (UL47), und zwei Glykoproteine (US4 = gG, US5 = gJ) kodieren. Weder die Deletion der einzelnen Gene noch die gemeinsame Deletion von gG mit dem 3'-terminalen Teil von UL47 führte zu einer signifikanten Hemmung der Virusausbreitung in Hühnerzellkulturen. Allerdings waren die maximalen Titer der UL47- und gJ-negativen Viren um etwa 90 % niedriger als die des Ausgangsvirus und von Virusrevertanten, in deren Genome die vorher deletierten Gene wieder eingesetzt worden waren. Im Gegensatz dazu zeigte gG-negatives ILTV Wildtyp-ähnliche *In-vitro*-Wachstumseigenschaften.
Infektionsversuche in Hühnern ergaben, dass die UL47-negativen ebenso wie die gG- und UL47-doppelt negativen Mutanten auch nach Applikation hoher Virusdosen nur noch geringfügige Krankheitssymptome auslösten, und dass gJ-negatives ILTV praktisch apathogen war. Außerdem wurden die Deletionsmutanten von den infizierten Tieren in deutlich geringeren Mengen ausgeschieden als das parentale Wildtyp-Virus. Die nach Reparatur des UL47- bzw. gJ-Gens erhaltenen Revertanten führten dagegen wie das Ausgangsvirus zu schweren Erkrankungen und Mortalitätsraten von über 30 %, was bestätigte, dass die untersuchten Gene tatsächlich wichtige Virulenzfaktoren des ILTV darstellen. Ungeachtet des Ausbleibens klinischer Symptome entwickelten die mit den Deletionsmutanten immunisierten Hühner ILTV-spezifische Antikörper und waren vollständig gegen die Belastungsinfektionen mit hoch pathogenem ILTV geschützt. Somit könnten sowohl UL47- als auch gJ-negative ILT-Viren als stabil attenuierte, genetisch definierte und damit molekularbiologisch von Feldviren unterscheidbare Lebendvakzinen geeignet sein
Während das UL47 Protein bei der humoralen Immunantwort auf eine ILTV-Infektion offensichtlich keine Rolle spielt, enthielten die untersuchten Seren aller mit dem Wildtyp-Virus oder den Virusrevertanten infizierten Hühner gJ-spezifische Antikörper, die durch indirekte Immunfluoreszenztests mit dem in Zellkultur exprimierten Produkt des klonierten gJ-Gens nachweisbar waren. Dagegen fehlten solche Antikörper wie erwartet in den Seren der Tiere, die mit gJ-negativen ILTV-Mutanten immunisiert worden waren. Letztere könnten somit auch als sogenannte DIVA (***D**ifferentiating **I**nfected from **V**accinated **A**nimals*) Vakzinen eingesetzt werden und die Eradikation der ILT erleichtern.

1.13.7 Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV-1)

Das Bovine Herpesvirus vom Typ 1 (BHV-1) gehört zum Genus *Varicellovirus* der Unterfamilie *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 gE-spezifischer Antikörper (Markerdiagnostik). Dieses Prinzip wird auch als DIVA-Strategie (***D**ifferentiating **I**nfected from **V**accinated **A**nimals*) bezeichnet. Die laufenden Arbeiten zu BHV-1 haben das Ziel Virusaufbau, -replikation und -pathogenese besser zu verstehen und die Bekämpfung betreffende Maßnahmen wie die Vakzinierung, Markerdiagnostik und BHV-1-Epidemiologie zu untersuchen.

Epidemiologische Untersuchung von Risikofaktoren für BHV-1 in Milchviehbetrieben in Niedersachsen

Teuffert, J.*, Pötzsch, C. J. und Wiedl, K.

Das Ziel dieser Fall-Kontroll-Studie ist es, die Risikofaktoren für das Auftreten der BHV-1 in Milchviehbetrieben in Niedersachsen aufzuzeigen. Während des ersten Jahres wurden ca. 80 Problem- und Kontrollbetriebe in fünf Landkreisen ausgewählt. Die Daten dieser Betriebe wurden mit Hilfe eines Fragebogens gesammelt. Diese Daten setzen sich aus Betriebsdaten, aus Angaben zum Management und den Tieren sowie aus Informationen zur Krankheitsgeschichte und der BHV-1-Überwachung zusammen.
Da diese Studie durch die Niedersächsische Tierseuchenkasse finanziert wird, werden dort regelmäßig Zwischenergebnisse vorgelegt. Einige der Schwerpunkte beinhalten:

- Gegenwärtig ist die Impfung der Reagenten nahezu die einzige Vakzinierung, die in den Betrieben praktiziert wird. Jedoch muss die Impfstrategie (Reagentenimpfung, Gesamtbestandsimpfung, Alter der Tiere bei Erstimpfung) an die BHV-1-Situation des jeweiligen Betriebes angepasst werden. Die Bekämpfung der BHV-1 sollte flächendeckend erfolgen.
- Reagenten sollten zeitnah aus dem Betrieb entfernt werden.
- Die Dokumentation durchgeführter Impfungen sowie die erzielten labordiagnostischen Untersuchungsergebnisse sind insbesondere im Hinblick auf die Kontrolle des Sanierungserfolges in den Betrieben zu verbessern.
- Veterinärhygienische Schutzmaßnahmen, einschließlich Quarantäne, bedürfen einer strikten Einhaltung.

Im Jahre 2005 wird die Datenerfassung beendet sein. Die Daten werden analysiert und die Ergebnisse der Studie veröffentlicht.

Weiterentwicklung der BHV-1-Markerdiagnostik

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

Zentraler Bestandteil der BHV-1-Bekämpfung mit gE-deletierten Markervakzinen ist der Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern. Um Spezifität und Sensitivität der Systeme weiter zu steigern, wurde ein BHV-1-gE-ELISA auf Basis rekombinanter gE/gI-Komplexe entwickelt. Mit Hilfe des Baculovirus-Expressionsystems BAC-to-BAC wurde der BHV-1-gE-gI-Komplex exprimiert und zur Beschichtung von ELISA-Platten verwendet. Unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers AB66 konnte ein funktionierendes *blocking*-ELISA-System etabliert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Expression von gE oder gE/gI ohne die entsprechenden Transmembrananker eine effiziente Abgabe der rekombinanten Proteine in den Zellüberstand erfolgte. Derzeit wird geprüft, ob sich diese sezernierten Proteine für den Aufbau kompetitiver wie auch indirekter ELISA-Tests zum Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern eignen. Hierbei soll auch verstärkt Milch als Probenmaterial berücksichtigt werden.
Die kommerziellen gE-Antikörper-Diagnostika detektieren in *blocking*-ELISAs gE-Antikörper, die ein bestimmtes Epitop blockieren. Um „Escape"-Mutanten, die zwar gE exprimieren, aber keine dieses Epitop blockierenden Antikörper induzieren, korrekt zu erfassen, wurde ein gE-*blocking*-ELISA auf Basis des gE-spezifischen monoklonalen Antikörpers 4D7 etabliert und validiert. Referenzseren werden durch diesen Test korrekt klassifiziert und in ersten Versuchsreihen mit Problemseren von sogenannten BHV-1-„Pseudoimpflingen" (BHV-1-ungeimpften Rindern, die BHV-1-Antikörper-positiv und BHV-1-gE-Antikörper-negativ reagieren) konnten bisher keine Hinweise auf BHV-1-*Escape*-Mutanten gefunden werden.

Bei direktem BHV-1-Nachweis – beispielsweise über PCR – spielt zunehmend die Differenzierung von positiven Ergebnissen in „gE-deletiertes Impfvirus“ oder „gE-positives Wildtyp-Virus“ eine Rolle. Daher wurde eine multiplex Real-time-PCR entwickelt, die in einem Ansatz BHV-1-Genom im Bereich von gD- und gE-kodierenden Abschnitten detektiert. Zusätzlich werden PCR und Extraktion über eine interne Kontrolle (IC) geprüft. Das System beruht auf der Amplifikation sehr kleiner Fragmente (63 bis 85 Basenpaare) und der Amplifikatdetektion mit markierten Taqman^{R}-Sonden. Hierbei werden drei Fluoreszenzfarben genutzt: FAM (gD), HEX (IC) und CY5 (gE). Erste Validierungsdaten zeigen eine hohe Sensitivität des Systems, die zwischen 30 und 300 Genomkopien pro PCR-Ansatz liegt. Ferner konnte gezeigt werden, dass zahlreiche BHV-1-Stämme detektiert werden, während andere Herpesviren keine Signale liefern. Nah verwandte Herpesviren wie BHV-5 ergeben deutlich reduzierte Signale.

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

Beer, M.* , Kalthoff, D. und König, P.

Zur weiteren molekularen Analyse und einfachen Mutagenese von BHV-1 wurde zudem das gesamte Genom als sogenanntes bakterielles artifizielles Chromosom (*bacterial artificial chromosome* = BAC) kloniert. Derzeit werden neue BHV-1-Stämme als BAC-Klone produziert, wobei die Insertion der BAC-Kassette innerhalb des TK-Gens erfolgt. Hierbei werden BHV-1-Stämme, aber auch ein BHV-5-Isolat verwendet. Über homologe Rekombination wurden in *E. coli* Gene des existierenden BHV-1-BAC jeweils durch ein Kanamycinresistenzgen ersetzt und nach Transfektion der mutierten Virus-DNA in bovine Zellen die entsprechenden Deletionsmutanten rekonstituiert und charakterisiert. Hierbei wurden zahlreiche BHV-1-Doppelmutanten hergestellt, die derzeit näher charakterisiert werden (BHV-1-ΔgE-ΔgM, BHV-1-ΔgE-ΔgN, BHV-1-ΔgE-ΔUL48, BHV-1-ΔgE-ΔUL49, BHV-1-ΔgE-ΔTK). Erste Ergebnisse weisen auf erhebliche Wachstumsdefekte (*cell-to-cell spread* und Wachstumskurven) für die Mutanten BHV-1-ΔgE-ΔgM, BHV-1-ΔgE-ΔgN, BHV-1-ΔgE-ΔUL49 und BHV-1-ΔgE-ΔUL48 hin.
Für die *trans*-Komplementierung der Deletionsmutanten wurden erstmals Expressionskonstrukte auf der Basis nicht zytopathogener BVDV-Replikons verwendet. Hierbei konnte durch die UL49-Expression des Replikons ncp7_ΔNpro-p7_UL49 eine Komplementierung des Defektes in KOP-R-Zellen erreicht werden.

Bovine Herpesvirus Typ 1 als Expressionsvektor

Keil, G.*

Die Spaltung von membrangebundenen und sezernierten Proteinen durch Furin im trans-Golgi Netzwerk 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 Furinspaltstellen im Abstand von 27 Aminosäuren besitzt. Dieses sogenannte pep27 wird nach Spaltung des F_0 ausgeschnitten. Wir konnten zeigen, dass dies im Prinzip auf virale Proteine, die nur einmal durch Furin gespalten werden, übertragbar ist. Dazu wurden offene Leserahmen für das grün fluoreszierende Protein (GFP), bovines Interleukin 2 (boIL-2) und bovines alpha-Interferon (boIFN-alpha) zusammen mit einem Furin Spaltmotif unmittelbar neben der für die Furinspaltstelle kodierenden Sequenz im offenen Leserahmen für das essenzielle Glykoprotein B (gB) des bovinen Herpesvirus 1 (BHV-1) integriert. Die transiente Expression

der resultierenden gB-Mutanten in Zellkultur zeigte, dass intrazellulärer Transport und Prozessierung nicht beeinträchtigt waren. Für die Analyse der funktionellen Eigenschaften der mutierten gB-Proteine wurden die jeweiligen Gene an Stelle des Wildtyp-Genes in das Genom von BHV-1 integriert. Die so erhaltenen rekombinanten Viren zeigten keine auffälligen Unterschiede in Bezug auf die Vermehrung in Zellkultur. Lediglich das boIFN-alpha exprimierende Virus induzierte kleinere Plaques in Zellkulturen. Biochemische und funktionelle Untersuchungen zeigten, dass boIL-2 und biologisch aktives GFP bzw. boIFN-alpha in das Medium infizierter Zellkulturen sezerniert wurde. Dies zeigte, dass sich dieses neuartige Expressionssystem eignet, rekombinante Proteine in funktioneller Form als durch Furin ausschneidbare, sezernierte Proteine zu exprimieren.

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

Zur Verbesserung von BHV-1-Markervakzinen wurden in einem Tierversuch sowohl eine gE und UL49 deletierte BHV-1-Doppelmutante als auch die gE-*Escape*-Mutante AUS12 mittels Immunisierung und BHV-1-*Challenge*-Infektion charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass die *Escape*-Mutante AUS 12 sowohl nach intramuskulärer als auch intranasaler Applikation einen guten Schutz vor Klinik und eine messbare Reduktion der *Challenge*-Virus-Ausscheidung vermittelte. Die Applikationsart spielte dabei interessanterweise keine Rolle.

1.13.8 Herpesviren der Fische

Untersuchungen zur Immunisierung von Glasaalen (*Anguilla anguilla*) gegen Infektionen mit dem *Herpesvirus anguillae* (HVA)
Bergmann, S.M.* und Fichtner, D.
(in Zusammenarbeit mit Lange, B. [Riemser Arzneimittel AG] und Bentlage, H. [ALBE-Fischfarm])

Zunehmend wird über hohe Verluste bei der Aufzucht von Aalen in der Aquakulter berichtet. Eine Ursache dafür ist die Infektion mit dem *Herpesvirus anguillae* (HVA), dem Erreger der sogenannten „Rotkopf-Krankheit“. In einer Fischfarm wurden erste Untersuchungen zur Reduzierung der Verluste durch immunprophylaktische Maßnahmen durchgeführt. Zur Herstellung einer Antigenpräparation wurde ein HVA-Isolat aus dem Bestand in EK-1-Zellen vermehrt und mittels PCR und Immunfluoreszenz auf Identität geprüft. Die Virusinaktivierung erfolgte durch Erwärmung auf 80 °C (Kerntemperatur) für mindestens zwei Stunden. In einer Aal-Farm wurden 800 kg Glasaal in die Untersuchung einbezogen. 400 kg Glasaal wurden mittels Bad, dem die HVA-Antigenpräparation zugesetzt wurde (1 l Antigenpräparation für 1 kg Glasaal), immunisiert (Immersion). 100 kg Glasaal wurde in gleicher Art und Weise in einem Bad mit Medium behandelt (Placebo-Gruppe). 300 kg der Glasaale blieben unbehandelt. Während der Immunisierung und 30 Tage p.v. traten keine erhöhten Verluste in den Versuchsgruppen auf. Nach dem Umsetzen in den Mastbereich der Fischfarm erkrankten Aale aller drei Gruppen durch den hohen Infektionsdruck an der Rotkopfkrankheit. Die Morbidität lag bei den vakzinierten Tieren bei ca. 50 %, in den beiden negativen Kontrollgruppen bei 80 - 100 %. Die Aale zeigten nicht nur Hämorrhagien an den Köpfen, sondern am gesamten Körper. Die Futteraufnahme war stark reduziert. Nach einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen wurde in der immunisierten Gruppe eine Mortalität von 13 % ermittelt. In den beiden Kontrollgruppen betrugen die Verlustraten 55 bzw. 60 %.

In einer weiteren Gruppe sehr junger Aale, die nicht behandelt, aber zur gleichen Zeit wie die Versuchsgruppen in der Anlage gehalten wurden, wurden Verluste von nahezu 100 % registriert. Aus den verendeten Aalen konnte Virus isoliert und als HVA identifiziert werden.
Um die durch HVA bedingten Verluste zu vermindern, wurden nachfolgend junge Glasaale sofort nach der Anlieferung mit der Antigenpräparation durch Bad immunisiert. Vier Wochen später erfolgte eine Booster-Immunisierung. Bisher waren ein aktives Krankheitsgeschehen oder überdurchschnittliche Verluste bei den immunisierten Aalen nicht zu beobachten.
Im Rahmen eines geförderten Projektes (Drittmittel) sind weitere Untersuchungen zur Immunprophylaxe bei Aalen am Modell der HVA-Infektion geplant.

Erster Nachweis und Bestätigung von KHV in Nutzkarpfen in Polen
Bergmann, S.M.* und Fichtner, D.
(in Zusammenarbeit mit Kempter, J. und Sadowski, J. [Universität Szczecin, Aquakulturdepartment, Polen])

Seit 2001 wird in Polen ein Massensterben bei Nutzkarpfen beobachtet. Neben klimatischen Faktoren wurden Vergiftungen und infektiöse Geschehen dafür verantwortlich gemacht. In der Fischhälterung der Universität Szczecin kam es seit 2003 zu einer gehäuften Sterblichkeit bei Nutzkarpfen. Schon in ersten Untersuchungen konnte KHV mittels PCR nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden durch weitere PCRs, nested PCRs und *In-situ*-Hybridisierungen mit verschiedenen Sonden bestätigt. Für Polen, ein Land mit sehr hoher Cyprinidenproduktion, sind diese Befunde alarmierend.

1.14 PAPILLOMAVIREN

Vergleichende Untersuchungen zur Pathogenese von equinen Sarkoiden bei Zebras (Equus burchellii) und Pferden
Teifke, J.P.*, von Felbert, I., Riebe, R. und Karger, A. (in Zusammenarbeit mit Löhr, C.V. und Gustafson, S. [Oregon State University, Corvallis, OR, USA]; Juan-Sallés, C. [Africam Safari, Puebla, México]; Garner, M.M. [Northwest ZooPath, Monroe, WA, USA]; McClean, M. [Safari Game Search Foundation, Winston, OR]; Hertsch, B. [Pferdeklinik der Freien Universität (FU) Berlin]; Köhler, L. [Tierklinik Wahlstedt] und Scheidemann, W. [Tierklinik Hochmoor-Gescher])

„Equine Sarkoide“ sind Fibrosarkom-ähnliche, lokal aggressiv und invasiv wachsende, überwiegend fibroblastische Neoplasien der Haut von Pferden. Zur Untersuchung der Hypothese, dass auch bei anderen Equiden eine Infektion mit Bovinen Papillomviren (BPV) der Typen 1 oder 2 die wichtigste Voraussetzung zur Tumorentstehung ist, wurden Sarkoide von vier in verschiedenen zoologischen Gärten gehaltenen Zebras (Equus burchellii) histopathologisch und molekularpathologisch untersucht. Die Sarkoide waren im Bereich des Nasenrückens, an den Nüstern, Augenlid und in der Inguinalgegend sowie am Präputium lokalisiert. Histopathologisch handelte es sich in allen Fällen um in der Dermis lokalisierte, kompakte, nicht von einer Kapsel umgebene, schlecht abgegrenzte Spindelzelltumoren mit mäßiger epithelialer Hyperplasie und Bildung langer Reteleisten. Mittels PCR und DNA-Sequenzierung war es bislang möglich, bei drei Sarkoiden jeweils ein 244 bp großes Fragment mit Sequenzhomologie zu BPV Typ 1 (98 % Identität) nachzuweisen. Die *In-situ*-Hybridisierung führte in allen Tumoren zu Kernsignalen in den proliferierenden mesenchymalen Tumorzellen.

Von drei natürlich entstandenen Sarkoiden bei Pferden wurden inzwischen primäre Zellkulturen etabliert. Aus einem Tumor konnten sowohl epitheliale als auch mesenchymale Zellpopulationen isoliert werden. Mittels PCR war es möglich, nur aus der DNA der mesenchymalen Tumorzellen BPV Typ 1-spezifische Sequenzen zu amplifizieren, während die epithelialen Zellen negativ waren. Dies unterstützt die Ansicht, dass Epithelzellen des Pferdes nicht permissiv für bovine Papillomviren sind.

1.15 NICHT KLASSIFIZIERTE VIREN

Erste Ergebnisse zu Ultrastruktur und Morphogenesestadien eines Virusisolates von Koi-Karpfen in Zellkulturen

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

Im Rahmen der Diagnostik von Koi-Herpesviren und damit einhergehender Studien zu ihrer Morphogenese wurde ein zytopathogenes Isolat vom Koi-Karpfen (DF29/03, Dr. Neukirch, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) elektronenmikroskopisch untersucht.
Zum direkten Erregernachweis im Negativkontrastverfahren wurden unbehandelte Sedimente infizierter Zellkulturen verwendet. Für die Ultradünnschnittuntersuchungen wurde das Virusisolat auf CCB-Zellen (common carp brain) angezüchtet und zu verschiedenen Zeiten post infectionem nach üblichen Methoden präpariert.
Erste Negativkontrastuntersuchungen ließen zahlreiche sphärische Viruspartikeln unterschiedlichen Durchmessers (100-150 nm) erkennen. Sie besitzen deutlich erkennbare Oberflächenprojektionen und sind hinsichtlich ihrer Ultrastruktur nicht vom Erreger der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV „Glesvaer 2/90“, angezüchtet auf salmon head kidney [SHK-1] Zellen) zu unterscheiden.
Die infizierten Zellen zeigen typische Stadien einer Virusvermehrung. Dazu gehören vor allem die nur an der Zellmembran ablaufenden Reifungsstadien (budding) und eine während dieser Phase filamentöse Partikelstruktur (Durchmesser 90-100 nm). Intrazelluläre Reifungsstadien an zytoplasmatischen Membranen oder virusspezifische Einschlüsse ließen sich nicht nachweisen.
Erste Vergleiche hinsichtlich Ultrastruktur und Morphogenese mit bisher bekannten Viren lassen Ähnlichkeiten zum ISAV, einem Vertreter der *Orthomyxoviridae*, erkennen.
Mittels Immunelektronenmikroskopie und ISAV-spezifischen Antikörpern ließ sich an gereinigten und angereicherten Virionen des neuen Isolates jedoch keine serologische Verwandtschaft zum ISAV nachweisen.

1.16 IMMUNOLOGIE

1.16.1 Immunsystem des Schweines

Etablierung von porcinen MHC II Tetrameren

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 die funktionelle und strukturelle Charakterisierung des porcinen MHC-peptide-TCR Komplexes. Das MHC II Molekül besteht aus einer alpha- und einer beta-Kette sowie einer transmembran Domäne, die verantwortlich ist für die Fusion beider Ketten und die Präsentation des Moleküls auf der Zelloberfläche. Mit Hilfe von RNA aus Splenozyten und unter Verwendung spezifischer Primer konnten beide Untereinheiten isoliert werden. Ausgehend von den isolierten Sequenzen wurden zwei Expressionskassetten hergestellt, welche neben der alpha- bzw. beta-Kette ein Dimerisationsmotiv anstelle der transmembran Domäne sowie ein Biotinylierungsmotiv für die Bildung des MHC II Tetramers enthielten. Diese Kassetten werden in eu- und prokaryontischen Systemen auf ihre Expressionsfähigkeit analysiert, um die gewonnenen Ketten für die Bildung von MHC II Tetrameren einzusetzen.

1.16.2 Immunsystem des Geflügels

Phänotypische Charakterisierung aviärer gamma/delta-T-Zellen
Berndt, A.*, Pieper, J. und Methner, U.

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. In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass im peripheren Blut von Hühnerküken drei durch die unterschiedliche Expression des CD8α-Antigens charakterisierte Subpopulationen von γδ ($TcR1^+$)-T-Zellen existieren: (i) stark CD8α-exprimierende γδ-T-Zellen ($CD8\alpha^{+high}/TcR1^+$-Zellen); (ii) schwach CD8α-exprimierende γδ-T-Zellen ($CD8\alpha^{+dim}/TcR1^+$-Zellen) und (iii) CD8α-negative γδ-T-Zellen ($CD8\alpha^-/TcR1^+$-Zellen).
Zur näheren phänotypischen Charakterisierung dieser Zellen wurde begonnen, die drei definierten γδ-T-Zellpopulationen bezüglich der Expression weiterer Oberflächenantigene (CD4, CD8ß, CD28, MHC-II) zu untersuchen. Dazu wurde das Blut von ca. 56 Tage alten Hühnerküken präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.
Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, 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 $CD8\alpha^{+high}/TcR1^+$-Zellen das CD8αβ Heterodimer und ca. 85 % der $CD8\alpha^{+dim}/TcR1^+$ Zellen das CD8αα Homodimer des CD8-Moleküls auf der Oberfläche. Außerdem trägt ein geringer Teil der $CD8\alpha^{+high}/TcR1^+$- (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. Die Daten verdeutlichen, dass die Population der aviären peripheren CD8α-positiven γδ-T-Zellen eine heterogene Population darstellt. Ob und inwieweit sich die einzelnen γδ-T-Zellsubpopulationen auch funktionell unterscheiden, soll in zukünftigen Studien näher beleuchtet werden.

1.16.3 Immunsystem des Fisches

Fischer, U.*, Köllner, B., Utke, K., Stachowski, A. und Kotterba, G.
(in Zusammenarbeit mit Koppang, E.O., [Oslo, Norwegen]; Hordvik, I. [Bergen, Norwegen]; Dijkstra, J.M. [Toyoake, Japan]; Ototake, M., Somamoto, T. [Tamaki, Japan]; Nakanishi, T. [Tokio, Japan]; Rebl, A., Seyfert [Dummerstorf]; Höger, B. [Konstanz]; Schwaiger, J. [Wielenbach] und Van den Heuvel, M. [Rotorua, Neuseeland])

Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen MHC Klasse II der Regenbogenforelle

Nach Immunisierung mit rekombinanten MHC II-Proteinen wurden monoklonale Antikörper gegen das MHC II von Salmoniden hergestellt. Die mAk markieren Leukozyten aus Blut, Milz und Kopfniere. Im Gegensatz zu Säugern wurden auch über 90 % aller Thymozyten markiert. In Gewebsschnitten lymphoider Organe wurden runde bis polymorphe Zellen von den mAk erkannt. Im Darm waren sphärische Zellen in der Mukosa, in den Kiemen Epithelzellen und Makrophagen-ähnliche Zellen in der Basis der sekundären Lamellen positiv. Diese Gewebsverteilung entspricht der, die von Koppang et al. (Fish and Shellfish Immunology, 2003) mit einem polyklonalen anti-MHC II-Antiserum beim Lachs gefunden wurde. In der Immunpräzipitation wurde ein ca. 32 kDa großes Protein von den mAk gebunden.
In Funktionsuntersuchungen konnte die Spezifität der mAk für MHC II bestätigt werden. Nach Immunisierung von Forellen mit Modellantigenen stieg der Anteil markierter Leukozyten stark an. In Doppelmarkierungsstudien zeigte sich, dass vor allem B-Lymphozyten, Granulozyten und überraschenderweise auch Thrombozyten MHC II exprimieren. Nach immunmagnetischer Anreicherung mittels der drei mAk wurde eine bis zu 20-fach höhere Expression MHC II-spezifischer mRNA gefunden. Die hier charakterisierten mAk sind ausgezeichnete Werkzeuge für die Untersuchung der Immunreaktion von Forellen.

Der 8. Internationale Workshop zu Humanen Leukozyten-Differenzierungs-Antigenen (HLDA8)

Vom 12. bis zum 16. Dezember 2004 fand in Adelaide, Australien, der 8. Internationale Workshop und Konferenz für Humane Leukozytendifferenzierungsantigene (HLDA8) statt. Der Workshop setzte sich aus mehreren Sektionen, einschließlich einer „Tierhomologon-Sektion“ zusammen, deren Aufgabe die Analyse und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen humane CD-Marker mit Zellen anderer Spezies war. Damit sollte das eingeschränkte Repertoire von mAk gegen CD-Marker anderer Tierspezies erweitert werden. Im Rahmen dieser Sektion wurden Untersuchungen an folgenden Spezies vorgenommen: Karpfen, Wels, Forelle, Huhn, Ente, Hund, Katze, Mink, Kaninchen, Pferd, Büffel, Ziege, Schaf, Schwein, Dromedar, Kamel, Delphin, Rhesusaffe, Eulenaffe, Pavian, Schimpanse. Unser Labor nahm mit FACS-, immunhistochemischen und Western Blot-Untersuchungen an Karpfen und Forelle teil. Von den 377 getesteten mAk erwiesen sich lediglich fünf als kreuzreaktiv. Weiterhin wurde deutlich, dass die von uns als kreuzreaktiv getesteten mAk verschieden von den mAk waren, die mit Säugetierleukozyten von Nichtprimaten reagierten. Das weist darauf hin, dass sich Fischleukozyten evolutionär von Säugerleukozyten unterscheiden bzw. den Fischen einige der entsprechenden Leukozyten-oberflächenantigene fehlen.

Das CD4-Homolog der Regenbogenforelle

Das CD4-Molekül von Säugetieren ist ein Korezeptor des T-Zellrezeptors (TCR), welcher an das MHC-Klasse II-Molekül auf antigenpräsentierenden Zellen bindet. Gleichzeitig ist CD4 ein populationsspezifischer Marker für T-Helferzellen. In Zusammenarbeit mit unseren japanischen Partnern wurde das CD4-Homologon der Regenbogenforelle kloniert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist eine relativ hohe Homologie zu den

entsprechenden CD4-Sequenzen von Mensch, Maus und Huhn auf. Computergestützte 3D-Analysen ergaben strukturelle Übereinstimmungen mit bekannten CD4-Molekülen. Mittels real-time-RT-PCR wurde eine hohe mRNA-Expression in den lymphatischen Organen Thymus, Milz und Kopfniere festgestellt. Von den peripheren Blutleukozyten zeigten magnetisch angereicherte Ig-negative Lymphozyten die höchste mRNA-Expression des CD4-Homologs. Die CD4-Expression konnte durch T-Zellmitogene und durch konventionelle gemischte Leukozytenreaktion stimuliert werden. Magnetisch angereicherte MHC-Klasse II-positive Leukozyten stimulierten die CD4-Expression stärker als MHC-Klasse II-negative Leukozyten. Sowohl eine DNA-Immunisierung gegen virale Proteine als auch eine virale Infektion von Forellen moduliert die CD4-Expression in Regenbogenforellen.

Zellvermittelte Zytotoxizität von Blutleukozyten der Regenbogenforelle gegen VHSV-infizierte Zellen

Über zellvermittelte antivirale Immunmechanismen bei Fischen ist wenig bekannt. Bei höheren Vertebraten sind sowohl unspezifische zytotoxische natürliche Killer (NK)-Zellen als auch spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) die Effektoren einer zellvermittelten Zytotoxizität. Die spezifische Zytotoxizität bei Säugern ist MHC-Klasse I restringiert, wobei MHC I der zytotoxischen Effektorzellen und der Targetzellen identisch sein müssen. Unser experimentelles System besteht aus klonalen Regenbogenforellen und Targetzellen mit identischer MHC-Klasse I. Plasmid-DNA, kodierend für das G- bzw. N-Protein des Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV) wurde an klonale Forellen appliziert, um die Expression der entsprechenden viralen Proteine und damit eine Proliferation zytotoxischer Zellen zu induzieren. Die zytotoxischen Zellen wurden entweder aus dem Blut DNA immunisierter oder VHSV infizierter Fische isoliert, und deren zytotoxische Aktivität gegenüber virusinfizierten Zellen *in vitro* getestet. Diese war ausschließlich gegen virusinfizierte Zellen gerichtet. PBL von Fischen, die gegen das G-Protein immunisiert worden waren, lysierten sowohl MHC-I-kompatible als auch MHC-II-inkompatible Targetzellen, während PBL von N-Protein immunisierten Forellen nur MHC-I-kompatible Zellen lysierten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass verschiedene virale Proteine auch verschiedene zytotoxische Zellen aktivieren. Die Daten ergaben außerdem, dass sowohl Stärke als auch Charakter der antiviralen zellvermittelten Immunreaktionen jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen.

Toxikologische Untersuchungen zur Biokonzentration von Humanpharmaka und ihren Effekten auf das Immunsystem in Bachforellen (Salmo trutta f. Fario)

Diclofenac gehört zu den am häufigsten in der aquatischen Umwelt gefundenen Pharmaka. Der konstante Eintrag von Diclofenac in Oberflächengewässer über Kläranlagen führt zu einer chronischen Exposition aquatischer Lebewesen mit Konzentrationen im niedrigen µg/L Bereich. Da Pharmaka die Eigenschaft besitzen, spezifisch in bestimmte Regulations-mechanismen einzugreifen, können schon niedrige Konzentrationen zu Veränderungen physiologischer Vorgänge führen. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Exposition von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) mit Diclofenac-Konzentrationen im Bereich der in Oberflächengewässern vorliegenden Mengen zu verminderten Hämatokrit-Werten und erhöhter Serum-Lysozym Aktivität führen kann. Darüber hinaus wurden eine Beeinflussung entzündungsvermittelnder Leukozyten-Populationen in der Niere sowie eine Einwanderung von Thrombozyten in die primären Kiemenlamellen beobachtet. Verteilungskinetiken mit i.p. appliziertem Diclofenac zeigten, dass Diclofenac in Fischen einen enterohepatischen Zyklus eingeht und somit nicht vollständig ausgeschieden wird. Versuche zur Hemmung der Prostaglandin E_2-Synthese in Makrophagen der Kopfniere deuten darauf hin, dass Diclofenac in Bachforellen denselben Wirkmechanismus besitzt wie bereits für Säugetiere beschrieben. Eine Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität und entsprechende Inhibition der PGE_2-

Synthese in Fischen könnte somit ähnliche Auswirkungen haben wie für Säugetiere bekannt und folglich eine Vielzahl von physiologischen Funktionen beeinträchtigen.

Immunhistologische Untersuchungen lymphoider Organe moribunder Bachforellen – Ist eine Schädigung des Immunsystems ursächlich für das Bachforellensterben?

Seit einigen Jahren wird im Alpenvorland Bayerns, aus Vorarlberg und der Schweiz während der Sommermonate ein Sterben von Bachforellen beobachtet. Vor allem Fische aus den Ober- und Mittelläufen größerer Fließgewässer sind von diesem Geschehen betroffen. Die Fischverluste sind mittlerweile erheblich und für die Wasserwirtschaft unter dem Aspekt des nachhaltigen Arten- und Gewässerschutzes von besonderer Bedeutung.

Die Ursache für das Auftreten dieses Phänomens ist ungeklärt. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Faktoren im Gewässer selbst (z. B. chemische, chemisch-physikalische oder biologische Faktoren) eine entscheidende Rolle spielen. Neben schwerwiegenden Veränderungen im Bereich von Leber, Kiemen und anderen Organen wurde bei den sterbenden Bachforellen eine deutliche Blutarmut nachgewiesen.

Immunhistologische Untersuchungen an Organen moribund getöteter Forellen mit monoklonalen Antikörpern gegen Leukozytenpopulationen ergaben folgendes Bild:

Entzündungsreaktionen in Leber und Niere, hier vor allem in den Tubuli mit teils sehr hoher Zahl MHC II-positiver Entzündungszellen (Monozyten und Granulozyten); starke Depletion der Lymphozyten, vor allem der B-Zellen in der Milz. Unklar ist, ob dies mit einer Verbrauchskoagulopathie einhergeht und ob die Lymphozyten durch Apoptose untergehen.

Insgesamt ergibt sich ein Bild einer massiven Störung der Immunfunktionen, die zwangsläufig zum Tod der Forellen führen muss. Möglicherweise führt eine toxikologische Belastung zu einer Immunsuppression und nachfolgend zur Infektion mit bisher unbekannten Erregern, was den Verlust spezieller Zellen im Organismus erklären könnte.

2. BAKTERIEN

2.1 *Escherichia coli* (EHEC/STEC)

Geue, L.*, Naumann, J., Schrödel, W. und Krüger, M.
(teilweise in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bakteriologie und Mykologie, Universität Leipzig)

Analyse des humanen Gefährdungspotenzials von STEC/EHEC-Isolaten aus Rindern

Shiga-Toxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) der Serogruppen O165, O26, O103 und O157, die während eines dreijährigen Monitoring-Programms aus Rindern isoliert worden waren, wurden auf das Vorhandensein von solchen Virulenzmarkern untersucht, die in hohem Maße mit dem Auftreten von HUS (Hämolytisch Urämisches Syndrom) bzw. HC (Hämorrhagische Colitis) beim Menschen korrelieren. Weiterhin wurden STEC aus Serogruppen in die Untersuchungen einbezogen, die erst im vergangenen Jahr durch das RKI Wernigerode serotypisiert worden waren (z. B. O156, O159, O172) Die räumliche und zeitliche Verteilung sowie die Dynamik verschiedener identifizierter klonaler Gruppen innerhalb der einzelnen Serovare wurden auf der Basis molekulargenetischer Techniken analysiert.

Das komplette Panel der untersuchten Virulenzmarker wurde in fast allen Isolaten des Serovars O165:H25 gefunden. Alle Isolate waren mit einem *stx2*-Gen sowie mit einem Intimin-Gen ausgestattet. Die Subtypisierung der *stx2*-Gene sowie die anschließende DNA-Sequenzierung der kompletten A- bzw. B-Untereinheit dieser Gene zeigte eine 100 % Homologie zum entsprechenden Gen des EHEC-Stamms EDL933, einem typischen O157:H7-Stamm, der aus einem HUS-Patienten isoliert worden war. Die Intimin-Gene wurden nach Subtypisierung und DNA-Sequenzierung dem ε-Subtyp zugeordnet. STEC mit Intimin-Genen dieses Subtyps sind sehr häufig mit HUS-Fällen beim Menschen assoziiert. Zusätzlich wurden Plasmid-assoziierte Virulenzmarker (hly_{EHEC}, *katP*, *espP*) in fast allen Stämmen nachgewiesen. Damit besitzen die STEC des Serovars O165:H25 durchaus das Potenzial, schwerwiegende Erkrankungen beim Menschen hervorzurufen. Bei bovinen STEC anderer Serovare (O26) ist das humane Gefährdungspotenzial differenzierter zu bewerten.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass innerhalb der einzelnen Serovare verschiedene klonale Gruppen existieren können. Das Auftreten solcher klonalen Gruppen scheint räumlich und zeitlich begrenzt zu sein. Mittels Clusteranalysen konnte gezeigt werden, dass auch innerhalb der einzelnen klonalen Gruppen über die Zeit genetische Veränderungen stattfinden. Mögliche Hinweise auf Ursachen für das Verschwinden von klonalen Gruppen aus den Rinderherden wurden gefunden.

Einfluss von unterschiedlichen Fütterungsstrategien auf die Häufigkeit des Auftretens von STEC/EHEC in Rindern

Untersuchungen in Rinderbeständen sind darauf ausgerichtet, den Einfluss unterschiedlicher Fütterungsstrategien auf die Häufigkeit von *Escherichia coli* und insbesondere von STEC/EHEC zu untersuchen. Dazu wurden aus einer Herde von Hochleistungs-Milchkühen mit identischen Haltungsbedingungen zwei Gruppen von je sieben Tieren (gleicher Laktationsstatus) ausgewählt. Während die eine Gruppe der Kühe kraftfutterreich gefüttert wurde, wurde die zweite Gruppe auf rohfaserreiche Fütterung (Silagefütterung) umgestellt. Von allen Tieren beider Gruppen wurden über einen Zeitraum von drei Monaten Kot- und Blutproben genommen und anschließend mikrobiologisch und immunologisch untersucht. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH-Technik) und klassischen Keimzählverfahren mit anschließender Koloniehybridisierung (Detektion von STEC/EHEC) wurden neben *E. coli* verschiedene andere Keimgruppen im Rinderkot quantifiziert und charakterisiert.

Bei der Auswertung der Untersuchungen ließen sich weder für die Keimzahlen von *E. coli*

noch für die anderer Keimgruppen (*Clostridium perfringens*, Hefen) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen nachweisen. STEC bzw. potenzielle EHEC konnten in beiden Gruppen über den gesamten Zeitraum gefunden werden.

Weitere Projekte

Sequenzierung und Strukturanalyse der Pathogenitätsinsel (PAI) des Enterohämorrhagischen E. coli (EHEC) O165:H25 Stammes Wus 02/09/010-1 aus einem Rind
Geue, L.*, Jores, J. und Wieler, L.H. (Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin)

Identifikation und Charakterisierung von STEC/EHEC isoliert von Menschen, Rindern und Ziegen aus Tansania mittels Real-Time-PCR, Serotypisierung und Pulsfeld-Gelelektrophorese
Geue, L.* und Mashood, R.

Evaluierung diagnostischer Tests mit und ohne Goldstandard unter Verwendung konventioneller, maximaler Wahrscheinlichkeit sowie Bayesianischer Statistik für Virulenzfaktoren boviner Shiga-Toxin-produzierender Escherichia coli (STEC)
Döpfer, D., Geue, L., Buist, W. und Engel, B.

Dynamik Shiga toxin-produzierender Escherichia coli (STEC) aus deutschen Rindern
Döpfer, D., Geue, L., de Bree, J. und de Jong, M.C.M.

2.2 Chlamydien und Coxiellen

Nachweis von *Chlamydophila psittaci/abortus* im induzierten Sputum von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung
Theegarten, D., Anhenn, O., Hotzel, H., Sachse, K*., Rohde, G.

Voruntersuchungen bei Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) zeigten teilweise hohe Antikörpertiter gegen *Chlamydophila (Cp.) pneumoniae*, insbesondere bei Exazerbationen. Ebenso ergaben sich Hinweise auf das Vorhandensein von Chlamydien bei Patienten, bei denen eine operative Lungenvolumenreduktion durchgeführt wurde. Ziel dieser Studie war es, Proben induzierten Sputums von Patienten mit COPD auf Chlamydien zu untersuchen. Dazu wurden DNA-Extrakte von Sputumproben (n=55) von 42 Patienten (Altersmedian: 68 Jahre, Altersspanne: 44 - 82 Jahre) mit einer stabilen bzw. exazerbierten COPD mittels nested PCR in der *omp*1-Genregion auf *Cp. pneumoniae* und *Cp. psittaci/abortus* getestet.
Bei zwölf von 42 Patienten (28,6 %) konnte Ziel-DNA der Speziesgruppe *Cp. psittaci/abortus* nachgewiesen werden. *Cp. pneumoniae* wurde überraschenderweise nicht gefunden. Um die Speziesidentität festzustellen, wurden fünf Amplifikate sequenziert und über BLAST analysiert. Es ergaben sich dreimal *Cp. psittaci* und zweimal *Cp. abortus*. Die Resultate der quantitativen Bestimmung der Chlamydienkopien mittels Real-Time-PCR in der 23S rRNA-Genregion wurden in Relation zur Zellzahl der jeweiligen Probe normalisiert und als Einschluss-bildende Einheiten (EBE) pro 10.000 Zellen angegeben. Hier konnten in den *Chlamydophila*-positiven Fällen Infektionsraten zwischen 2,1 und 39,1 EBE pro 10.000 Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis der Speziesgruppe *Cp. psittaci/abortus* in Sputumproben

bei Abwesenheit klinischer Symptome einer Psittakose/Ornithose wurde bisher nicht in der Literatur berichtet und wirft neue interessante Fragen auf. Weitere Untersuchungen bezüglich des möglichen zoonotischen Hintergrundes sind erforderlich.

Schwere Septikämie einer Schwangeren verursacht durch eine *Chlamydophila abortus*-Infektion in einer Ziegenherde

Hotzel, H.*, Sachse, K. und Walder, G.

Chlamydophila (*C.*) *abortus* ist bekannt als auslösendes Agens von Aborten bei Wiederkäuern (enzootischer Schafabort). In Verbindung mit Infektionsgeschehen bei Schafen wurde in den letzten Jahren auch über mehrere schwere Erkrankungen bei schwangeren Frauen berichtet, die zu Fehlgeburten führten.
Im vorliegenden Fall wurde eine 32-jährige Schwangere mit hohem Fieber in ein Krankenhaus eingewiesen. Trotz Antibiotikagabe verschlechterte sich ihr Zustand. Es kam zum Abort und zur Verlegung auf die Intensivstation mit künstlicher Beatmung wegen progressiver Septikämie, Schock und beginnendem Multiorganversagen.
Bis zu diesem Zeitpunkt konnte keine mikrobiologische Ursache der Septikämie identifiziert werden. Blutkulturen blieben steril und Vaginalabstriche brachten keinen Hinweis auf eine Infektion mit Bakterien, Ureaplasmen oder Mykoplasmen. Während auch serologische Tests auf *Chlamydia trachomatis* und *C. psittaci* negativ ausfielen, erbrachte die Real-Time-PCR von DNA-Extrakt des Serums einen positiven Chlamydiennachweis. Daraufhin wurde die Patientin mit Clarithromycin behandelt. Der Zustand besserte sich und die künstliche Beatmung konnte nach zwölf Tagen beendet werden. Nach 21 Tagen wurde sie gesund nach Hause entlassen.
Die Patientin berichtete vom Kontakt mit Abortmaterial von Ziegen auf ihrem Bauernhof während ihrer Schwangerschaft. In der Ziegenherde von etwa 60 Tieren hatten mehrere Ziegen verlammt. Von den Ziegen wurden Vaginalabstriche genommen, ebenso wurden verschiedene Organe abortierter Ziegenfeten untersucht. Amplifiziert und sequenziert wurde ein ca. 400 bp langer Bereich des *omp*A-Gens von Chlamydien. Dabei stellte sich heraus, dass bei den Ziegen sowohl *C. psittaci* als auch *C. abortus* vorkamen. In den Organen wurde ausschließlich *C. abortus* festgestellt. Auch im Patientenserum und im Fetus wurde dieser Keim gefunden. Beim Vergleich der DNA-Sequenzen wurde vollständige Übereinstimmung aller *C.-abortus*-Stämme aus diesem Geschehen festgestellt.
Als Ursprung der *C.-abortus*-Infektion wurde der Zukauf eines Bockes vermutet. Auch bei ihm sowie bei zwei männlichen Nachkommen konnte *C. abortus* gefunden werden. Durch natürliche Besamung wurde die Ziegenherde infiziert, was zu den vorher nicht vorkommenden Aborten führte. Die jungen Böcke wurden durch den Deckakt infiziert. Die Schwangere infizierte sich trotz Warnung des Tierarztes durch Kontakt mit dem Abortmaterial.

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

Henning, K.*, Geue, L. und Conraths, F.J.

A) Chlamydien

Chlamydien sind als Erreger der verschiedensten Erkrankungen bei Haustieren bekannt. An den Chlamydien-Erkrankungen des Rindes sind die Spezies *Chlamydia (C.) pecorum* und *C. psittaci* beteiligt, beim Schwein die Spezies *C. trachomatis*, *C. pecorum* und *C. psittaci*. Die Taxonomie innerhalb der Ordnung *Chlamydiales* wurde im Jahre 1999 revidiert, wobei Familien, Gattungen und Arten neu definiert bzw. neu benannt wurden. Die oben genannten

Spezies werden nun als *Chlamydophila (Cp.) pecorum*, *Cp. psittaci*, *Cp. abortus* und *C. suis* bezeichnet.
Sowohl beim Rind als auch beim Schwein wurden Chlamydien-Infektionen u. a. im Zusammenhang mit Fruchtbarkeitsstörungen, Pneumonien, Arthritiden und Konjunktividen nachgewiesen. Auch intestinale Infektionen sind bekannt. Ausgehend von infizierten Schweinebeständen erkrankten auch Menschen an Chlamydien. Besonders gefährdet sind hierbei sowohl Tierhalter als auch Tierärzte. Um die tatsächliche Verbreitung von Chlamydien in den landwirtschaftlichen Betrieben und somit auch das Gefährdungspotenzial abschätzen zu können, wurden Schweine aus sechs Betrieben in Niedersachsen und drei Betrieben in Nordrhein-Westfalen beprobt (Serum- und Tupferproben). Die Ergebnisse zeigten, dass Chlamydien in Schweinebeständen weit verbreitet sind. Wie schon in der Literatur beschrieben, erwies sich die KBR als wenig geeignet für die Untersuchung von Schweineseren auf Chlamydien-Antikörper und sollte durch andere serologische Methoden, wie z. B. den ELISA oder den Immunoblot, ersetzt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der alleinige Nachweis des Erregers nicht ausreicht, um die Beteiligung von Chlamydien am Krankheitsgeschehen im Bestand zu beweisen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen weitere 23 Betriebe beprobt. Zurzeit erfolgt die Auswertung der klinischen Daten im Zusammenhang mit den Ergebnissen der serologischen Untersuchungen.

B) Coxiellen

Der Erreger des Q-Fiebers, *Coxiella burnetii*, ist ein sehr kleines, gramnegatives, obligat intrazelluläres Bakterium. Der Erreger hat ein breites Wirtsspektrum, das vor allem Zecken, Vögel und Säuger umfasst. Seine Bedeutung hat *Coxiella burnetii* insbesondere als Aborterreger bei Wiederkäuern. Außer bei den domestizierten Wiederkäuern Rind, Schaf und Ziege kommen Coxiellen-Infektionen auch bei Zootieren und beim Gatterwild vor. Besonders reichlich ist der Erreger im Fruchtwasser, in den Nachgeburten und den Lochien enthalten, aber auch Kot, Urin und Milch können Coxiellen enthalten. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt aerogen über eine Tröpfcheninfektion oder durch Aufnahme von infiziertem Staub. Ferner werden Coxiellen auch durch Zecken übertragen. Im Süden Deutschlands spielt hierbei insbesondere die Schafzecke *Dermacentor marginatus* eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des sogenannten Wildtierzyklus. Neben der kutanen Übertragung der Coxiellen durch den Saugakt kann der Erreger auch durch Inhalation erregerhaltigen Zeckenkotes übertragen werden. Besonders gefährdet Q-Fieber-Erkrankungen zu entwickeln sind einerseits Personen, die beruflich starken Kontakt mit Tieren haben wie Landwirte, Tierärzte, Hirten und Schafscherer sowie Schlachthofpersonal, und andererseits Personen, die sich im Bereich von größeren Tierherden, insbesondere in der Ablammperiode aufhalten. Im Landkreis Soest, Nordrhein-Westfalen, kam es Ende Mai/Anfang Juni 2003 zur bisher größten Q-Fieber Epidemie in Deutschland mit über 300 Erkrankten. Diese hatten im Rahmen eines Bauernmarktes eine Ausstellung mit lammenden Schafen besucht.
Die zurzeit laufenden Untersuchungen, die in Zusammenarbeit mit dem Veterinäramt des Kreises Soest erfolgen, sollen Aufschluss über die Bedeutung der Zecken als Reservoir für den Q-Fieber-Erreger geben. Auf Grund der klimatischen Verhältnisse handelt es sich bei den gesammelten Zecken, im Gegensatz zu den Verhältnissen in Süddeutschland, um Angehörige der Gattung *Ixodes*. Die Untersuchungen erfolgen sowohl mittels PCR wie auch mit Hilfe des Zellkulturversuchs. Von den bisher untersuchten Zeckenproben reagierte bisher eine Probe positiv in der Coxiellen-PCR. Dieses Ergebnis ist daher bemerkenswert, da die Zecken der Gattung *Ixodes* hierzulande nicht als Überträger des Q-Fiebers gelten.

Q-Fieber – Diagnostik von Abort-Proben
Henning, K.*, Geue, L. und Conraths, F.J.

Infektionen mit Coxiellen spielen bei Wiederkäuern insbesondere als Abortursache eine erhebliche Rolle. In der Literatur werden auch andere empfängliche Spezies, z. B. das Schwein, genannt. Daher werden systematisch alle eingehenden Abort-Proben mittels PCR auch auf Coxiellen untersucht. Coxiellen-positive Befunde ergaben sich bisher aber ausschließlich bei Proben von Wiederkäuern. Die durchgeführten Untersuchungen dienen in der Regel zur Abklärung bzw. Bestätigung von Befunden, die von Veterinäruntersuchungsämtern erzielt wurden. In diesen erfolgt der Antigennachweis oftmals nur mittels Stamp-Färbung von Ausstrichpräparaten veränderter Nachgeburts- oder Fetusteile.
In Laborvergleichsuntersuchungen hat sich gezeigt, dass die für die Diagnostik der Coxiellose eingesetzten PCRs durchaus zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Zurzeit laufende Untersuchungen, die in Zusammenarbeit mit dem Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg sowie mit dem Veterinärdienst des Kreises Soest (NRW) durchgeführt werden, sollen zu einer Optimierung der Coxiellen-PCR führen. Eine weitere Option ist die Möglichkeit der Anzüchtung des Q-Fieber-Erregers mittels Zellkultur. Diese Methode, die zeit- und arbeitsintensiv ist, hat in der Vergangenheit hin und wieder zu positiven Resulaten geführt, auch wenn die PCR negativ war. Möglicherweise spielen hier Inhibitoren eine Rolle. Aus Gründen einer zuverlässigen Diagnostik wird die Zellkultur bei jeder Probe parallel zur PCR mitgeführt.

Weitere Projekte

Pathogenese von Chlamydien-assoziierten Erkrankungen des Rindes
Sachse, K., Schubert, E., Theegarten, D.und Reinhold, P.

Bedeutung der Chlamydien für Fruchtbarkeitsstörungen bei Schweinen
Melzer, F., Kauffold, J., Hotzel, H., Berndt, A., Reinhold, P. und Sachse, K.

Erregerreservoir und zoonotische Bedeutung von Chlamydien
Reinhold, P., Sachse, K., Theegarten, D. und Hotzel, H.

Ultrastrukturelle Untersuchung von mit Chlamydia sp. infizierten Zellkulturen nach Zusatz eines Antibiotikums oder Eisenchelatbildners
Liebler-Tenorio, E.M., Göllner, S. , Sachse, K.

Pathologie von subklinischen chronischen Infektionen der Lunge mit Chlamydia sp. beim Rind
Liebler-Tenorio, E.M., Reinhold, P., Jäger, J.

2.3 Mykobakterien

2.3.1 Tuberkulose

Nachweis und genotypische Charakterisierung von Mykobakterien, insbesondere *M. avium,* bei Schlachtschweinen in Deutschland

Sirimalaisuwan, A. und Moser, I.*

M. avium ist der wichtigste Erreger nicht tuberkulöser Mykobakteriosen des Menschen. Erkrankungen mit diesen Erregern betreffen vor allem Menschen mit geschwächtem Immunsystem aber auch immunkompetente Personen, vor allem in Verbindung mit anderen Grundkrankheiten. *M. avium* kommt in der Umwelt weit verbreitet vor und wird auch aus vielen animalen Wirten (Säuger, Vögel, Arthropoden) isoliert. Im Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabor für Tuberkulose wurden im Jahre 2004 insgesamt in 252 eingesandten Verdachtsproben, 142 davon vom Schwein, *M. avium* nachgewiesen, wovon wiederum 53 als *M. avium* ssp. *avium* und 114 als *M. avium* ssp. *hominissuis* identifiziert wurden. Die Bedeutung dieser Befunde unter dem Aspekt der Lebensmittelsicherheit wurde in einer als Querschnittsstudie angelegten Untersuchung zum labordiagnostischen Nachweis des Vorkommens von Erregern des *Mycobacterium avium-intracellulare* Komplexes (MAIC) bei Schlachtschweinen in Deutschland untermauert. Konventionell gehaltene Tiere von drei Schlachthöfen aus drei geographisch weit von einander entfernt liegenden Regionen, acht Tiere aus Südbaden, 88 Tiere aus Niedersachsen und 78 Tiere aus Thüringen wurden untersucht. Zusätzlich wurden 43 „ökologisch“ gehaltene Tiere beprobt. Es wurden Tiere mit und ohne makroskopische Veränderungen untersucht. In etwa 30 % der Fälle war mehr als ein Körperlymphknoten infiziert. Die Schweine aus dem „Öko“-Bestand zeigten etwa doppelt so hohe Prävalenzen (60 %) wie die Schweine aus konventionell geführten Beständen (32.05 %), ohne pathologische Veränderungen aufzuweisen. Anhand der Untersuchung mit PCR wurde *Mycobacterium* (*M.*) *avium* ssp. *hominissuis* am häufigsten identifiziert. Dies ist auch die Spezies, welche bei *M. avium*-Infektionen des Menschen in der Regel isoliert wird.
Weiter gehende Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung mittels Makrorestriktions-analyse zeigten, dass etwa 44 % der untersuchten Isolate einer einzigen klonalen Gruppe angehörten. Die regionale Herkunft der betreffenden konventionell gehaltenen Schweine umfasste Thüringen, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen und die Niederlande. Auch die meisten Tiere des „ökologisch“ geführten Betriebes in Thüringen waren mit Erregern dieser klonalen Gruppe belastet. Bei einem Vergleich mit früher im Referenzlabor untersuchten Isolaten wurden die gleichen molekularen Charakteristika auch bei bovinen Isolaten festgestellt, die im Jahre 2000 im Rahmen eines Tuberkuloseausbruches aus einer Rinderherde im Landkreis Cloppenburg isoliert worden waren. Die Charakterisierung der Isolate mittels Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus ergab ein wesentlich unschärferes Bild im Hinblick auf klonale Verwandtschaften.
Nach den Ergebnissen dieser Studie stellen mit Mykobakterien belastete Schweine eine mögliche Infektionsquelle für den Verbraucher dar. Ein beträchtlicher Prozentsatz der Tiere weist keine oder nur geringradige pathologisch-anatomische Veränderungen auf. Weitere Untersuchungen sollten unternommen werden, um nachzuweisen, inwieweit klinische Isolate vom Menschen aus verschiedenen Regionen Deutschlands ebenfalls diesem prävalenten Erregertyp angehören, um eine Risikoabschätzung vornehmen zu können. Weiterhin sollten Tiere aus weiteren „ökologisch“ geführten Betrieben näher untersucht werden.

Charakterisierung von *Mycobacterium caprae* durch Typisierung von „Mycobacterial Interspersed Repetitive Units“ (MIRU) für epidemiologische und phylogenetische Untersuchungen

Prodinger, W. M., Köfler, D., Naumann, L., Aranaz, A., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Erler, W., Boschiroli, M. L., Brandstätter, A., Pavlik, I., und Moser, I. *

Die Rindertuberkulose, hervorgerufen durch *Mycobacterium bovis*, ist seit Anfang der sechziger (West) bzw. Ende der siebziger Jahre (Ost) des vorigen Jahrhunderts in Deutschland getilgt. Das Auftreten des Erregers in Rinderbeständen wird nur noch sporadisch nachgewiesen, meist im Rahmen von Schlachtkörperuntersuchungen. Häufig sind nur Einzeltiere betroffen. In jüngster Zeit wurden jedoch größere Ausbrüche bekannt, die zeigten, dass sich der Erreger unerkannt in Beständen ausgebreitet hatte, so dass mehrere hundert Tiere des jeweiligen Bestandes infiziert waren und getötet werden mussten. Das epidemiologische Geschehen der *M. bovis*–Tuberkulose ist sehr komplex, da der Erreger ein breites Wirtsspektrum besitzt und auch bei anderen Haus- und Wildtierspezies sowie beim Menschen Tuberkulose hervorrufen kann.
Seit der erfolgreichen Tilgung der *M. bovis* Tuberkulose des Rindes und der Einführung der Pasteurisierung der Milch hat der Erreger in Deutschland auch in der Humanmedizin an Bedeutung verloren. Noch etwa 1 % der menschlichen Tuberkulose-Erkrankungen ist heute auf eine Infektion mit *M. bovis* zurückzuführen gegenüber 10 - 30 % zu Zeiten vor der Tilgung. Bei etwa einem Drittel der Isolate handelt es sich dabei um *M. caprae (*früher *M. bovis* ssp. *caprae)*. Die große Mehrheit dieser Isolate stammt aus dem süddeutschen Raum.
Bei der bovinen Tuberkulose ist dieses Nord-Süd-Gefälle ebenfalls vorhanden. In den Bundesländern Baden-Württemberg und Bayern wird als Erreger in Verdachtsfällen beim Rind meist *M. caprae* isoliert.
Auch in anderen süd-, mittel- und osteuropäischen Ländern ist *M. caprae* bei Rindern nachgewiesen worden. In einer Studie zur molekularen Epidemiologie von *M. caprae* in Europa wurden 175 Isolate von Mensch und Tier aus neun europäischen Ländern von Spanien bis zur Ukraine, gesammelt in einem Zeitraum von 25 Jahren, auf der Basis der „Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU)“ charakterisiert. Die MIRU-Typisierung ist eine neue PCR-basierte Methode, die ein deutlich größeres Unterscheidungspotenzial als die Spoligotypisierung aufweist und weniger aufwändig ist als die DNS-DNS-Hybridisierung auf der Basis des IS*6110*. Daher scheint sie für die Ermittlung von Übertragungs- und Ausbreitungswegen des Erregers besonders gut geeignet zu sein.
In einer phylogenetischen Interferenzanalyse wurden die in dieser Studie erhaltenen MIRU-Muster mit MIRU-Daten von weltweit isolierten Stämmen des *M. tuberculosis*-Komplexes (MTC) verglichen. Die Ergebnisse unterstrichen die aktuelle Vorstellung, dass *M. caprae* als eine eigene Spezies innerhalb des MTC anzusehen ist, zwar eng verwandt, aber doch getrennt vom „klassischen“ *M. bovis*. Eine Untergliederung der Stämme nach ihrer regionalen Herkunft oder Wege der Ausbreitung von bestimmten klonalen Gruppen ließen sich jedoch aus dem Dendrogramm nicht ableiten.

Weitere Projekte

Tuberkulose und Paratuberkulose bei Wild in Deutschland
Moser, I.*, Hotzel, H., Köhler, H., Möbius, P. Lentzsch, P., Schettler, E. und Fröhlich K.

Nachweis und molekulare Charakterisierung von Mykobakterien bei Haus- und Zootieren
Moser, I.*, Hotzel, H. und Möbius, P.

2.3.2 Paratuberkulose

Einarbeitung und Bewertung des Interferon-γ-Testes hinsichtlich seiner Eignung zur frühzeitigen Erkennung einer Infektion mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Paratuberkulose) in Rinderbeständen

Köhler H.*, Bacher, E. und Möbius, P.

Die frühe Phase einer Infektion mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*Map*) beim Rind ist gekennzeichnet durch eine zelluläre Abwehrreaktion, bei der es auch zu einer T-Zell-Sensibilisierung kommt. Die Freisetzung von Interferon-γ (IFN-γ) durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes gilt als sensitives diagnostisches Verfahren für den Nachweis von Tuberkulose oder Paratuberkulose. Für die Diagnostik der Rindertuberkulose existiert ein kommerzieller, in Deutschland jedoch nicht zugelassener IFN-γ-Test (BOVIGAM, Biocor, USA). Um zwischen Rindertuberkulose, Paratuberkulose und einer Infektion mit Umwelt-Mykobakterien zu unterscheiden, werden bei diesem Test die IFN-γ-Mengen, die nach Stimulation mit bovinem PPD (purified protein derivative) freigesetzt werden, mit denen verglichen, die nach Stimulation mit aviärem PPD gebildet werden. Für die Diagnostik der Paratuberkulose existiert jedoch bisher kein einheitliches Interpretationsschema.
Die Bekämpfung der Paratuberkulose wird u.a. dadurch erschwert, dass bei Kälbern und Jungrindern eine Diagnostik mit Hilfe des Antikörpernachweises und des direkten Erregernachweises fast unmöglich ist. Eine Serokonversion findet frühestens im Alter von zwei bis drei Jahren statt und die Erreger werden nur intermittierend und in sehr geringen Mengen ausgeschieden. Bei Infektionsversuchen an Kälbern konnte jedoch schon sehr früh eine IFN-γ-Reaktion nachgewiesen werden. Dies veranlasste uns, die Eignung des IFN-γ-Testes für die Diagnostik der Paratuberkulose bei Kälbern und Jungrindern zu untersuchen.
In den eigenen Untersuchungen wurden als Antigene bovines PPD, aviäres PPD und Johnin (*Mycobacterium paratuberculosis*-PPD) eingesetzt. Anhand der Reaktionen von definiert positiven und negativen Rindern werden verschiedene Interpretationsschemata evaluiert.
In einer laufenden Langzeitstudie wurden 100 weibliche Nachzuchttiere aus einem Bestand mit einer hohen Paratuberkulose-Prävalenz ab dem 6. Lebensmonat in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des IFN-γ-Testes und des Antikörpernachweises auf Paratuberkulose untersucht. Nach den bisherigen Ergebnissen reagierte die Mehrzahl der Kälber bereits im Alter von 12 - 15 Monaten positiv. Diese Reaktionen ließen sich bei nachfolgenden Untersuchungen bis zu einem Alter von 29 - 33 Monaten bestätigen. In diesem Zeitraum waren bei den untersuchten Tieren nur sporadisch Antikörperreaktionen gegen *Map* nachweisbar. Diese Ergebnisse sprechen für eine Sensibilisierung der Tiere durch *Map*, der genaue Infektionsstatus der einbezogenen Tiere ist bisher noch nicht bekannt.

Molekulare Epidemiologie von *M. avium* ssp. *paratuberculosis*

Möbius, P.*, Luyven, G. und Köhler, H.

Die Verbreitung der Paratuberkulose von Bestand zu Bestand erfolgt i. d. R. durch den Zukauf nicht erkannter subklinisch infizierter Tiere. Als Ursache für das Scheitern von Sanierungsverfahren wird auch ein Erregereintrag in die Rinderherden durch Kontamination der Weiden durch Wanderschafe bzw. Wildtiere diskutiert. Innerhalb der Herde gilt die direkte oder indirekte Übertragung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*Map*) von Muttertieren auf die Kälber als Hauptinfektionsweg. Mit Hilfe molekularer Typisierungsmethoden sollen potenzielle Infektionsquellen und Infektionswege detaillierter

analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden Schlussfolgerungen für effektivere Sanierungsmaßnahmen ermöglichen.
Die Durchführung molekular-epidemiologischer Untersuchungen setzt eine standardisierte und optimierte Massenkultivierung von M*ap*-Stämmen voraus. Auf dieser Basis wurden Paratuberkulose-Isolate von Rindern und Schafen aus verschiedenen Regionen bzw. Beständen Deutschlands molekularbiologisch typisiert. Zusätzlich wurden Isolate aus mehreren Organen und Geweben einzelner Tiere untersucht. Damit sollte abgeklärt werden, ob bei einem Tier unterschiedliche Map-Stämme nachweisbar sind. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass ein Tier mehrfach von verschiedenen Paratuberkulosestämmen infiziert werden kann.
Als Typisierungsmethoden dienten die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) für das Insertionssegment IS*900* (Pavlik *et al*. J Microbiol Meth 1999; 38:155-167) unter Verwendung von drei Verdauungsenzymen (BstEII, PstI und BamHI) und die Amplifikation von spezifischen „Mycobacterial interspaced repetitive units“ (MIRU-PCR; Bull *et al*. Mol Cell Probe 2003; 17:157-164).
Bisher liegen Ergebnisse zu insgesamt 50 Rinder-Isolaten vor. Es konnte eine relativ große Heterogenität von RFLP-Typen beobachtet werden. Die Bestände unterschieden sich in der Vielfalt der RFLP-Muster. Für die Restriktionsenzyme BstEII und PstI wurde eine Reihe neuer RFLP-Typen detektiert. Übereinstimmend mit der Literatur war der RFLP-Typ C1 (RFLP-BstEII) weit verbreitet. In einem Bestand wurden bei 15 bisher untersuchten Isolaten neun unterschiedliche RFLP-Muster allein unter Verwendung von BstEII gefunden. Bei bisher einem Tier konnten aus unterschiedlichen Organen *Map*-Stämme mit differenten RFLP-Typen isoliert werden. Die Diskriminierungsmuster der RFLP unter Verwendung der angegebenen drei Verdauungsenzyme waren deutlich größer als die der MIRU-PCR, die bisher insgesamt nur drei verschiedene Muster bei den Rinder-Isolaten ergab.
Bei den Schaf-Isolaten handelte es sich generell um nicht pigmentierte *Map*-Stämme. Mit der RFLP-BstEII wurden zwei neue, bisher nicht nachgewiesene so genannte I-Typen festgestellt. Außerdem konnten auch *Map*-Stämme mit RFLP-Mustern, die bisher als Rinder-typisch angesehen wurden, bei Schafen nachgewiesen werden. Daraus resultierende epidemiologische Zusammenhänge werden weiter verfolgt. Mit der MIRU-PCR konnte eine ähnliche Verteilung der unterschiedlichen Typen für die Schaf-Isolate beobachtet werden: zwei verschiedene MIRU-Typen, die nur bei den Schaf-Isolaten auftraten sowie ein MIRU-Typ, der bei den Rinder-Isolaten häufig vorkam.

Weitere Projekte

Einarbeitung und Validierung von direkten und indirekten Methoden zur Diagnostik der Paratuberkulose

Köhler, H. und Möbius, P.

Die pathogenetische Bedeutung von Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis bei chronischen entzündlichen Darmerkrankungen*

Borrmann, E., Gottschaldt, J., Möbius, P. und Köhler, H.

2.4 Salmonellen

Zur Epidemiologie der *Salmonella*-Infektion in Geflügelmastbeständen

Methner, U. * und Reiche, R.

Kenntnisse zur Epidemiologie der *Salmonella*-Infektionen in Geflügelmastbeständen sind Voraussetzung, um effektive Prophylaxe- und Bekämpfungsmaßnahmen einleiten zu können. Die Notwendigkeit, das Vorkommen von Salmonellen in Geflügelmastbeständen zu reduzieren, ergibt sich aus der Tatsache, dass Geflügelfleisch und Geflügelfleischprodukte (insbesondere Rohfleischerzeugnisse) nach wie vor eine bedeutende Infektionsquelle für *Salmonella*-Infektionen des Menschen darstellen.
Neben möglichen allgemein gültigen Kenntnissen zur *Salmonella*-Epidemiologie in diesem Bereich sollte in unserer Studie auch festgestellt werden, ob das Serovar *Salmonella* Paratyphi B d-Tartrat$^+$ im Vergleich zu anderen *Salmonella*-Serovaren möglicherweise eine stärkere Persistenz und Ausbreitungstendenz besitzt. Insbesondere in den Niederlanden, aber auch in der Bundesrepublik Deutschland, wurde in den letzten Jahren über ein vermehrtes Auftreten von *Salmonella* Paratyphi B d-Tartrat$^+$ in Geflügelmastbeständen berichtet.
In verschiedenen Mastbetrieben mit und ohne vorangegangene Nachweise von *Salmonella* Paratyphi B d-Tartrat$^+$ wurden umfangreiche mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt, um die Ausbreitung der Infektion unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren (Erregerpersistenz in den Hallen zum Zeitpunkt der Kükeneinstallung, Erregerbelastung der Küken, Antibiotika-Applikation) zu untersuchen.
Molekulare Untersuchungen, besonders Plasmidprofilbestimmung und Pulsfeldgelelektrophorese sind wertvolle Methoden zur Feintypisierung von *Salmonella* Paratyphi B d-Tartrat$^+$-Isolaten und daher für die Analyse des Infektions- und Kontaminations-Kreislaufes sowohl in den Herden als auch den Betrieben geeignet.
Es konnte gezeigt werden, dass *Salmonella*-freie Eintagsküken eine unabdingbare Voraussetzung sind, um *Salmonella*-freie Masthähnchen zu produzieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass der *Salmonella*-Status der Hallen zum Zeitpunkt der Einstallung der Küken als ein wesentlicher Risikofaktor betrachtet werden muss. Große Bedeutung besitzen die Fütterungseinrichtungen in den Hallen und die Abflüsse. Insbesondere *Salmonella*-kontaminierte Fütterungseinrichtungen sind aufgrund der hohen Empfänglichkeit von sehr jungen Küken für eine *Salmonella*-Infektion ein besonderes Problem. Getreideschimmelkäfer scheinen an der Ausbreitung der *Salmonella*-Infektion in der Herde beteiligt zu sein. Zu klären bleibt, ob sie für die Erstinfektion oder für die spätere horizontale Ausbreitung von größerer Bedeutung sind. Unabhängig davon sind effektive Maßnahmen zur Bekämpfung von Insekten erforderlich.
Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Antibiotika in den ersten Lebenstagen die *Salmonella*-Infektion nicht vollständig verhindert, sondern oft nur für begrenzte Zeit unterdrückt. Eine ständige Applikation von Antibiotika führt darüber hinaus zu einer resistenten Darm- und Umgebungsflora und nachfolgend evtl. zu Wirksamkeitsverlusten gegen die Zielpopulation und sollte daher nicht durchgeführt werden.
In experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *Salmonella* Paratyphi B d-Tartrat$^+$-Isolate nicht die Fähigkeit besitzen, die intestinale Kolonisation von Salmonellen anderer Serovaren wirksam zu hemmen. Die Untersuchungen ergaben keine Hinweise, dass *Salmonella* Paratyphi B d-Tartrat$^+$-Isolate eine stärkere Ausbreitungstendenz in der Herde besitzen als Stämme anderer Serovaren.

Genotypische Charakterisierung von *d*-Tartrate-positiven *Salmonella*-Paratyphi B-Isolaten aus Geflügelmastbeständen

Reiche R.* und Methner U.

Vor 1990 wiesen *d*-Tartrate-positive-Stämme der Serovar *Salmonella* Paratyphi B in Deutschland eine große genetische Vielfalt auf. Seit Mitte der 90er Jahre dominiert eine neue Gruppe von Stämmen, die auf eine klonale Linie des Erregers zurückzuführen ist. Diese Isolate zeigen ein einheitliches Makrorestriktionsprofil, jedoch eine Vielzahl von Antibiotika-Resistenzmustern und Plasmidprofilen.

In den Niederlanden wurde in den letzten Jahren eine starke Ausbreitung von *d*-Tartrate-positiven-Paratyphi B-Isolaten beim Mastgeflügel und Geflügelprodukten festgestellt, die aus dieser klonalen Linie des Erregers stammen. Das Auftreten humaner Infektionen in Schottland im Jahre 2002 beweist, dass die Virulenz dieser Erreger nicht zu unterschätzen ist. Durch den Vergleich von epidemiologischen Daten und den Makrorestriktionsmustern von Isolaten aus verschiedenen europäischen Ländern konnte ein Zusammenhang dieser humanen Infektionen mit dem Verzehr von kontaminiertem Geflügelfleisch hergestellt werden.

In unserer Studie sollte die Ausbreitung und Persistenz sowie Infektions- und Kontaminationswege von *d*-Tartrate-positiven-*Salmonella*-Paratyphi B-Isolaten aus verschiedenen Geflügelmastbeständen mit Hilfe molekularbiologischer Typisierungsmethoden detailliert untersucht werden. Dazu wurden 165 *Salmonella*-Paratyphi B-Stämme, die aus unterschiedlichen Bereichen verschiedener Geflügelmastbetriebe stammten, unter Verwendung von drei Methoden zur molekulargenetischen Typisierung von Salmonellen untersucht.

1) Plasmidprofilanalyse: Trotz der grundsätzlich gegebenen Mobilität von Plasmiden weisen Plasmidprofile bei Salmonellen eine sehr hohe Stabilität auf und sind daher für epidemiologische Untersuchungen geeignet. Plasmidanalysen bei Salmonellen kommt insofern auch eine besondere Bedeutung zu, weil einige Serovare dieser Gattung sehr große Plasmide besitzen, die sowohl Virulenz-assoziierte Gene als auch Resistenzgene tragen.

2) Makrorestriktionsanalyse: Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ist besonders geeignet, um Infektketten von durch Salmonellen verursachten Krankheiten zu untersuchen. Das diskriminatorische Potenzial der Methode wurde durch die Verwendung der drei Restriktionsenzyme *Xba*I, *Spe*I und *Bln*I gesteigert.

3) Subtracted Restriction Fingerprint (SRF): Diese Methode basiert auf dem Verdau der genomischen DNA mit zwei Restriktionsenzymen. Eine Optimierung der analysierten Banden hinsichtlich Anzahl und Größe erfolgt durch die selektive Bindung von spezifisch endmarkierten Fragmenten an Magnetpartikel.

Die Methoden erwiesen sich für die epidemiologische Fragestellung von unterschiedlicher Aussagekraft. Durch die Makrorestriktionsanalyse konnte gezeigt werden, dass alle Isolate zu der seit Mitte der 90er Jahre dominierenden klonalen Linie des Erregers gehören. Alle Stämme aus den Geflügelmastbeständen zeigten mit den drei eingesetzten Restriktionsenzymen das einheitliche PFGE-Profil X8/ S8/ B8 (Miko et al. 2002, J. Clin. Microbiol., 40, 3184-3191). Der ‚diskriminatorische Index' der Plasmidprofilanalyse lag mit 0,87 hoch und diese Methode erwies sich als sehr wertvoll, um Infektions- und Ausbreitungswege in den einzelnen Hallen und Betrieben zu analysieren. Dabei konnte festgestellt werden, in welchen Bereichen der Hallen eine Erregerpersistenz besteht und wie sich die nachgewiesenen unterschiedlichen Klone während der Mastdurchgänge in der Herde ausbreiten. Darüber hinaus konnte die Rolle von Insekten als Vektor für die Erregerausbreitung während der Mastdurchgänge eindeutig belegt werden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass in einigen Hallen bestimmte *Salmonella*-Paratyphi B-Isolate über längere Zeiträume persistieren. Das gleiche gilt für unterschiedliche Betriebe, in denen ebenfalls spezifische Stämme über längere Zeiträume vorherrschen. Die SRF-Methode erwies sich mit einem diskriminatorischen Index von 0,8 ebenfalls als sehr gut geeignet zur molekularen Typisierung der Feldisolate und bestätigte die gewonnenen

Ergebnisse. In weiteren Untersuchungen soll analysiert werden, ob das Vorhandensein bestimmter Isolate den Neueintrag von *Salmonella*-Stämmen beeinflusst.

Intestinale Besiedelungshemmung zwischen *Salmonella*-Stämmen bei Hühnerküken
Methner, U. *, Haase, A. und Rychlik, I.

Die Immunisierung mit *Salmonella*-Lebend- oder inaktivierten Impfstoffen 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 nicht-attenuierter *Salmonella*-Stämme an Eintagsküken innerhalb weniger Stunden eine Besiedelungshemmung gegen andere *Salmonella*-Stämme induziert werden. Gegenwärtig gibt es jedoch keine attenuierten *Salmonella*-Lebendimpfstoffe, die durch die Induktion eines schnell einsetzenden Hemmungseffektes die intestinale Besiedelung anderer Salmonellen verhindern und demzufolge sehr junge Tiere bereits kurze Zeit nach Applikation der Lebendimpfstoffe schützen können. In unseren Untersuchungen wurden *phoP*- und *rpoS*-Deletionsmutanten von *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis, entweder allein oder als Doppelmutanten mit *ompC* auf ihren Attenuierungsgrad und ihr Vermögen zur intestinalen Kolonisationshemmung der isogenen Elternstämme bei Hühnerküken getestet. Mutanten mit *rpoS*-Deletionen zeigten ein uneingeschränktes Vermögen zur intestinalen Besiedelungshemmung des Infektionsstammes, waren jedoch noch vollständig virulent für die Tiere. Mutanten mit Deletionen in *phoP*, entweder allein oder in Kombination mit *rpoS*, zeigten einen hohen Attenuierungsgrad, ein uneingeschränktes Vermögen zur intestinalen Besiedelung und eine fast vollständig erhaltene Fähigkeit, die Darmbesiedelung der isogenen Infektionsstämme zu hemmen. Stämme mit zusätzlicher Deletion in *ompC* wiesen im Vergleich zum Ausgangsstamm oder zu den *phoP*- und *rpoS*-Mutanten ein verringertes Vermögen zur intestinalen Besiedelungshemmung auf. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in *phoP* oder *phoP*-regulierten Genen zur Entwicklung von *Salmonella*-Lebendimpfstoffen mit neuartigen Eigenschaften geeignet sind.

B-Zell- und Makrophagen-Reaktion von Hühnerküken nach Applikation von *Salmonella*-Typhimurium-Stämmen
Berndt, A.* und Methner, U.

Trotz des Einsatzes umfangreicher Immunisierungsprogramme zur Bekämpfung von *Salmonella* (*S.*)-Infektionen in Geflügelbeständen sind die Kenntnisse über ablaufende Immunreaktionen, insbesondere auch über mögliche zelluläre Infiltrationen in verschiedene Organe nach Immunisierung und Infektion von Hühnerküken noch unzureichend. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass es nach *S.*-Infektion bzw. -Immunisierung zu Veränderungen der T-Zell-Zusammensetzung sowohl im peripheren Blut als auch in verschiedenen Organen von Küken kommt. In Ergänzung zu diesen Arbeiten wurde nun die B-Zell- und Makrophagen-Reaktion im Zäkum (IgA^+-, IgM^+-, IgG^+-Zellen, Makrophagen), in der Bursa Fabricii (IgM^+-Zellen, Makrophagen) und in der Milz (IgM^+-Zellen) nach Verabreichung eines *S.*-Typhimurium-Wildstammes bzw. eines attenuierten, kommerziell erhältlichen *S.*-Typhimurium-Lebendimpfstoffes an Eintagsküken im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren untersucht. Für diese Studie wurden immunhistochemische Methoden in Verbindung mit einer Computer-gestützten Bildauswertung genutzt.
Wie erwartet, kam es im Zäkum infizierter Tiere zwischen dem 5. und 12. Lebenstag zu einer Akkumulation von unreifen B-Zellen sowie IgM-produzierenden Plasmazellen. Bei immunisierten Tieren stieg der Anteil dieser Zellen nur unwesentlich. Im Vergleich dazu

konnten IgA-sezernierende Plasmazellen nach Infektion und Immunisierung erst ab dem 8. Lebenstag vermehrt im Zäkum beobachtet werden. Ein erhöhter Anteil von IgA^+-Zellen fand sich ebenfalls in den Organen Milz und Bursa Fabricii nach Infektion der Eintagsküken mit *S.* Typhimurium. Im Gegensatz dazu sank die Zahl der IgM^+-Zellen und der Makrophagen in der Bursa Fabricii zwischen dem 4. und 8. Tag nach Infektion und Immunisierung der Tiere deutlich. Diese Tatsache weist auf eine mögliche spezifische und unabhängige Rolle dieses Organs im immunologischen Abwehrgeschehen gegen Salmonellen hin. Insgesamt zeigten immunisierte Tiere im Vergleich zu infizierten Tieren qualitativ gleiche aber quantitativ abgeschwächte Reaktionen. Im Zusammenhang mit der in früheren Arbeiten gefundenen erhöhten T-Zell-Infiltration in verschiedene Organe ist festzustellen, dass im Abwehrgeschehen von Hühnerküken gegen *Salmonella*-Impf- und Wildstämme sowohl zellvermittelte (repräsentiert durch $CD8^+$-Zellen) als auch humorale Immunmechanismen von Bedeutung sind. Insgesamt zeigt sich, dass immunhistochemische Methoden zur Untersuchung zellulärer Infiltrationen in relevante Organe von Hühnern ein geeignetes Mittel zur Charakterisierung potenzieller *Salmonella*-Lebendimpfstoff-Kandidaten darstellen.

Weitere Projekte

Prophylaxe, Bekämpfung und Epidemiologie von Salmonella-Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren
Methner, U.* und Reiche, R.

Salmonella-freie Broiler durch eine Salmonella-Lebendimpfstoff induzierte Resistenz gegen die Besiedelung und Invasion mit Salmonellen sowie neuartiger Verfahren zur Elimination von Salmonella-Impf- und Feldstämmen
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.

Epidemiologische Untersuchungen zu Salmonella-Infektionen bei Diensthunden
Schotte, U. und Geue, L.*

2.5 Campylobacter

Genotypische und phänotypische Untersuchungen an *Campylobacter jejuni*-Isolaten von Putenschlachtkörpern nach dem Schlachtprozess

Borrmann, E.*, Hänel, I. und Müller J.

Vorrangiges Ziel der Untersuchungen zur *Campylobacter*-Pathogenese ist die Entwicklung von Verfahren, mit denen humanpathogene *Campylobacter*-Stämme erkannt werden können, um möglicherweise deren Verbreitung in den Beständen zu verhindern. Dazu müssen die Kenntnisse zum Erreger selbst und seiner Interaktion mit der Wirtszelle weiter vertieft werden. Zwar ist eine Vielzahl von Virulenzdeterminanten für die Erreger bekannt, ihre Bedeutung für die Campylobacteriose der Menschen ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Chemotaxis und Motilität, Adhäsion an Darmepithelzellen, Invasionsvermögen und Überleben in Darmepithelzellen sowie Toxinbildungsvermögen sind wichtige Virulenzfaktoren. Die Charakteri-

sierung von Subtypen mit verschiedenen Virulenzeigenschaften könnte ein wichtiger Schritt im Verstehen der Pathogenese von *Campylobacte*r-Infektionen sein. Ziel unserer Arbeit war es, *Campylobacter (C.) jejuni*-Isolate von Putenschlachtkörpern am Ende der Schlachtkette und aus der Schlachthofumgebung sowohl genotypisch zu charakterisieren als auch die phänotypische Ausbildung von Virulenzeigenschaften zu untersuchen, um mögliche Zusammenhänge zu erfassen.
Die Genotypisierung von elf bereits durch PFGE und AFLP charakterisierten *C. jejuni*-Stämmen wurde durch die *fla*-Typisierung mittels PCR-RFLP und durch Nachweis der Toxingene *cdtA-C* erweitert. Die Einteilung der elf Isolate in fünf Cluster durch PFGE nach *KpnI*-Verdau und AFLP wurde durch die *fla*-Typisierung bestätigt. Kein *fla*-Typ war in mehreren Clustern anzutreffen. In vier der fünf Cluster hatten alle Stämme den jeweils gleichen *fla*-Typ, in einem Cluster hatte jeder Stamm einen spezifischen Typ. Das von *Campylobacter*-Stämmen gebildete „cytolethal distending toxin" (CDT) wird durch drei Gene, *cdtA-C*, kodiert, die alle drei für die biologische Wirksamkeit unabdingbar sind. Die Toxingene *cdtA* und *cdtB* waren unabhängig von der im CHO-K1-Zellkulturtest nachgewiesenen toxischen Reaktion in allen elf untersuchten Stämmen nachweisbar. Bei drei Stämmen, die eine unspezifische Reaktion im Zelltest zeigten, konnte kein *cdtC*-Gen nachgewiesen werden.
Sowohl Adhäsion und/oder Invasion als auch Toxinbildung können auslösende Faktoren für die Zytokininduktion in Epithelzellen sein. Acht *C. jejuni*-Isolate wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Zytokinbildung in Epithelzellen nach Erregerkontakt mit humanen Darmepithelzellen (INT 407) zu induzieren. Bereits nach vier Stunden konnte mittels RT-PCR die Bildung der mRNA für Interleukin-8 (IL-8) bei allen Isolaten nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden wurde das gebildete IL-8 mittels ELISA in den Zellkulturüberständen quantitativ bestimmt. Für alle untersuchten Stämme wurde ein IL-8-Gehalt im Zellkulturüberstand von 200-300 pg/ml bestimmt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen hinsichtlich des gebildeten IL-8 konnte nicht nachgewiesen werden.
Die Erweiterung der Genotypisierung von elf *C. jejuni*-Isolaten durch den Nachweis weiterer Virulenz-assoziierter Gene (*fla*-Typisieung, *cdtA-C*) bestätigte, dass Differenzen im Aufbau des Genoms, die mittels Genotypisierungsmethoden erfasst werden, möglicherweise mit bestimmten phänotypischen Merkmalskombinationen korrelieren. Kein Zusammenhang konnte zur Induktion von Interleukin IL-8 gefunden werden. Diese Ergebnisse sollen in weiterführenden Untersuchungen durch die Einbeziehung weiterer Stämme bestätigt werden.

Differenzierung und *fla*-Typisierung von *Campylobacter-jejuni*- und C*ampylobacter-coli*-Isolaten

Müller, W.* und Müller, J.

Zur molekularbiologischen Differenzierung von *Campylobacter(C.)-jejuni*- und *C.-coli*-Isolaten sind PFGE, AFLP, Ribotyping, ERIC-PCR und *fla*-Typisierung beschrieben worden. Wir testeten, inwieweit eine Differenzierung mit der *fla*-Typisierung für die Bearbeitung zukünftiger epidemiologischer Fragestellungen geeignet ist.
Mehr als 80 *Campylobacter*-Isolate unterschiedlichster Herkunft, unter anderem vom Menschen, von Masthähnchen, Legehennen, Puten, Schweinen und Rindern wurden mittels PCR differenziert. Dazu wurden drei Primerpaare, basierend auf dem 16S rRNA-Gen für den Genus *Campylobacter* und dem *map*A-Gen für *C. jejuni* bzw. dem *ceu*E-Gen für *C. coli* in einer Multiplex-PCR eingesetzt, so dass gleichzeitig die Identifizierung und Differenzierung der *Campylobacter*-Spezies *C. jejuni* und *C. coli* erfolgte. Die untersuchten Isolate konnten in 51 *C. jejuni* und 30 *C. coli* differenziert werden, wobei bei Masthähnchen und Rindern nur *C. jejuni*, bei Legehennen, Puten und dem Menschen sowohl *C. jejuni* als auch *C. coli* und beim Schwein ausschließlich *C. coli* gefunden wurden.

Zur molekularbiologischen Charakterisierung wurden alle differenzierten Isolate Spezies-bezogen und nach Wirten getrennt sowohl nach ihrem *fla*A-Gen als auch nach ihrem *fla*B-Gen typisiert. Diese beiden aus jeweils 1.718 bp bestehenden Flagellen-Gene sind tandemartig auf dem Genom angeordnet. Die Amplifikation dieser Gene erfolgte in Anlehnung an das Campynet (http://campynet.vetinst.dk). Die jeweiligen PCR-Produkte (1.715 bp für *fla*A bzw. 1.670 bp für *fla*B) wurden mit *Dde*I und *Alu*I in separaten Restriktionen geschnitten. Die Auswertung der erhaltenen Restriktionsmuster erfolgte mit dem Programm GelCompare II (Fa. Applied Maths).
Beim Vergleich der beiden Typisierungen konnten wir feststellen, dass die in der Literatur beschriebene feinere Differenzierung durch die *fla*B-Typisierung nicht nachvollziehbar war. Außer bei den *C. jejuni*-Putenisolaten bestätigte in der Regel die *fla*B-Typisierung die *fla*A-Subtypen. Für die Puten-Isolate wurden dreizehn *fla*B-Subtypen, aber nur zehn *fla*A-Subtypen gefunden.
Die zehn *C. jejuni*-Isolate von Masthähnchen eines Mastdurchgangs gehörten zum gleichen *flaA*- und auch *fla*B-Typ. Damit konnte gezeigt werden, dass die *C.*-Isolate zu Beginn der Infektion in der dritten Woche des Mastdurchganges und an dessen Ende sowie in den örtlich getrennten Masthallen demselben *fla*-Typ angehörten, was auf einen klonalen Ursprung der Infektion hindeutet. Hingegen gehörten die *C.-jejuni*-Isolate von Legehennen eines Bestandes unterschiedlichen *fla*-Typen an. Die *C.-jejuni*-Isolate vom Rind bildeten drei *fla*A/B-Typen, was auf drei verschiedene Ausbrüche schließen lässt. Da alle *C. jejuni*-Isolate vom Menschen unterschiedlichen *fla*A/B-Typen angehörten, weist dies auf unterschiedliche Infektionsquellen hin.
Die elf *C.-coli*-Isolate vom Schwein bildeten sechs *fla*A- bzw. sieben *fla*B-Typen, wobei ein Cluster mit vier Isolaten und ein Cluster mit zwei Isolaten auftraten. Während die *C.-coli*-Isolate von Puten einen *fla*A/B-Typ bildeten, gehörten die *C.-coli*-Isolate von Legehennen unterschiedlichen *fla*A/B-Typen an, wobei acht Isolate ein Cluster bildeten. Die zehn *C.-coli*-Isolate des Menschen zeigten sechs *fla*A/B-Typen, was wiederum auf unterschiedliche Infektionen hindeutete.
Insgesamt zeigten die erhaltenen Restriktionsmuster der *C.-jejuni*-Isolate eine hohe Diversität. Die *C.-coli*-Isolate zeigten eine weniger ausgeprägte Diversität. Ihre genotypische Verwandtschaft zeigte sich in fünf Clustern für unterschiedliche Wirte. Auch hier bestätigte die *fla*B-Typisierung die *fla*A-Subtypen. Es konnte damit gezeigt werden, dass die *fla*-Typisierung von *C.-jejuni*- und *-coli*-Isolaten für zukünftige epidemiologische Untersuchungen, insbesondere zur Aufdeckung von Infektketten geeignet ist.

Weitere Projekte

Molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung von C.-jejuni-Isolaten nach Kolonisation im Kükendarm
Borrmann, E., Hänel, I., Müller, J., Müller, W. und Schulze, F.

Molekularbiologische Charakterisierung von Campylobacter-Isolaten
Müller, W., Müller, J. und Borrmann, E.

2.6 Burkholderia mallei

Verbesserung der Rotzdiagnostik

Raßbach, A.*, Gottschaldt, J., Marten, P. und Carmon, J.

Im internationalen Handel mit lebenden Tieren ist es notwendig, alle Equiden auf Antikörper gegen Rotz zu untersuchen.
Ein dafür durch die O.I.E. vorgeschriebenes Verfahren ist die Komplementbindungsreaktion (KBR). Sie gilt als eine sensitive und spezifische Nachweismethode für die Rotzantikörper. Dennoch wird die Bewertung der Ergebnisse der KBR durch eine Reihe von serologischen Kreuzreaktionen mit anderen Mikroorganismen (z. B. Pseudomonaden, Streptokokken) beeinträchtigt. Bei der Untersuchung von ca. 1.000 Pferdeblutserumproben in den letzten drei Jahren wurden in 2 % der Proben in der KBR positive Reaktionen mit dem Rotzantigen festgestellt. Zur Abklärung dieser Reaktionen in der KBR wurde ein Immunoblot (Western Blot) etabliert, der es erlaubt, die Spezifität dieser Reaktion zu überprüfen.
Im Western Blot wurden in den 2 % KBR-positiven Seren keine rotzspezifischen Antikörper nachgewiesen.

2.7 Brucellen

Untersuchungen zum Auftreten von Schweinebrucellose in Wildschweinbeständen Deutschlands

Melzer, F.*

Deutschland ist amtlich frei von Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen. Allerdings wurden in den letzten Jahren vereinzelte Fälle von Schweinebrucellose gemeldet. Der vorläufig letzte Fall stammt aus dem Jahr 2004. In einer Outdoor-Haltung in Mecklenburg-Vorpommern wurde eine Infektion mit *Brucella suis* Biotyp 2 diagnostiziert. Als Wildtierreservoir wurden in Europa bisher der Hase und das Wildschwein identifiziert. Es besteht somit die Möglichkeit, dass eine dieser Arten, wahrscheinlich das Wildschwein, für den Eintrag des Erregers in diesen Schweinebestand gesorgt haben könnte. Zur Verbreitung der Brucellose bei Wildschweinen in Deutschland liegen keine ausreichend aktuellen Daten vor. Ziel einer Studie des NRL in Zusammenarbeit mit den Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer ist die Ermittlung der Prävalenz dieser Infektion beim Wildschwein. Dazu werden Blutproben, die aus verschiedenen Bundesländern stammen, serologisch auf das Vorhandensein von *Brucella*-Antikörpern untersucht. Auf Grund der Kreuzreaktivität zwischen *Brucella suis* und *Brucella abortus* können alle serologischen Testverfahren angewendet werden, die auch bei der routinemäßigen Überwachung der Brucellosefreiheit in den landwirtschaftlichen Nutztierbeständen genutzt werden. Das Methodenspektrum kann lediglich durch die Qualität des Probenmaterials eingeschränkt werden. Die Untersuchungen sollen im Laufe des Jahres 2005 abgeschlossen werden.

2.8 Mykoplasmeninfektionen der Wiederkäuer

Nachweis von Persistenz und Oberflächenantigenvariation bei *Mycoplasma bovis* im Verlauf der experimentellen Mastitis

Byrne, W., Egan, J., Markey, B., Ball, H. und Sachse, K.*

Drei in der Laktation stehende Kühe wurden im rechten vorderen Zitzenkanal mit *Mycoplasma (M.) bovis*, Stamm Bx 89/97 (10^8 cfu/ml), aseptisch infiziert. Zwischen dem ersten und dritten Tag kam es zu vorübergehendem Fieber und einer Anschwellung des infizierten Euterviertels, von dem zunehmend serös-eitrige Flüssigkeit abgesondert wurde. Bei allen Kühen breitete sich die Infektion auf das rechte hintere Viertel aus, bei einer Kuh weiter auf alle vier Viertel. Die Sekrete der infizierten Viertel veränderten sich zunehmend zu einer wässrigen Suspension feiner Partikel. Während bei einer Kuh die Milchdrüsensekrete vier Wochen nach der Infektion wieder normal erschienen, trat dieser Zustand bei den beiden anderen Kühen erst bei der nächsten Laktationsperiode ein.
Der Verlauf der Infektion wurde an Hand der Reisolierung des Infektionsstammes und des Antikörper-ELISAs verfolgt. Dabei wurde der Erreger bei allen drei Kühen innerhalb der ersten sechs Wochen nach Infektion in allen Milchproben aus dem infizierten Viertel kulturell nachgewiesen. Bei zwei Kühen gelang der Nachweis auch noch in der folgenden Laktation.
Die Daten aus Kultur und Serologie zeigen, dass der Infektionsstamm im Rahmen einer persistenten intracisternalen Infektion in Gegenwart der spezifischen Immunantwort bis zu fünf Monate nach Infektion im Wirtstier noch vorhanden war. Die Expression bestimmter Oberflächenantigene der Vsp-Familie wurde in den seriellen *M.-bovis*-Reisolaten verfolgt, indem die aus den regelmäßig genommenen Milchproben auf Agar angezüchteten Kolonien mittels Kolonie-Immunoblotting unter Verwendung der Vsp-spezifischen monoklonalen Antikörper 1E5, 2A8, 4D7 und 9F1 charakterisiert wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich im Laufe der Infektion der quantitative Anteil jener Kolonien verändert, die ein bestimmtes Vsp-Protein exprimieren. Ob es sich hierbei um Phasenvariation (on/off switching), Größenvariation oder eine Kombination beider Phänomene handelt, kann nur durch weitergehende Untersuchungen auf der Ebene des genomischen *vsp*-Locus geklärt werden. Jedoch zeigen bereits die jetzt vorliegenden Daten, dass eine persistente *M.-bovis*-Infektion u. a. dadurch möglich wird, dass der Erreger der Immunantwort des Wirtes ausweicht, indem vorzugsweise solche Vsp-Phänotypen gebildet werden, die auf Grund ihrer Oberflächen-antigenausstattung besser überlebensfähig sind.

Weitere Projekte

Pathologie und Pathogenese der respiratorischen Veränderungen nach aerogener Inokulation von Kälbern mit Mycoplasma bovis
Liebler-Tenorio, E.M., Reinhold, P., Sachse, K.

2.9 Durch Zecken übertragene Krankheiten

Epidemiologie der Frühsommer-Meningoenzephalitis und weiterer durch Zecken übertragener Krankheiten

Süss, J.* und Klaus, Ch.

In den letzten 30 Jahren ist die Bedeutung der FSME als wichtigste durch Zecken übertragene Virusinfektion des ZNS in Europa kontinuierlich angestiegen. Im Projekt werden die

epidemiologischen Daten zur FSME (und weiterer durch Zecken übertragener Krankheiten) aus Deutschland (in Verbindung mit dem RKI und den entsprechenden Landesuntersuchungsämtern) und allen europäischen Ländern mit einem FSME-Risiko seit Jahren gesammelt, bewertet und veröffentlicht. Diese Datenbank wird von Ärzten, Tierärzten, Reisenden und einer breiten Öffentlichkeit intensiv genutzt.

2.10 Bakterielle und virale Mischinfektionen

Durch Mischinfektion mit Gram-negativen Bakterien bedingte granulomatöse Entzündung der Salzdrüsen in Jungenten (Anas platyrhynchos)

Klopfleisch, R., Polster, U. und Teifke, J.P.* (in Zusammenarbeit mit Müller, C. und Hildebrandt, J.-P. [Zoologisches Institut und Museum, Ernst Moritz Arndt-Universität, Greifswald])

So genannte “Nasendrüsen” kommen bei zahlreichen Vogelarten vor und stellen wichtige Ausscheidungsorgane für Natriumionen dar. Bei Enten finden sie sich in einer supraorbital gelegenen Einsenkung des Schädelknochens. Die granulomatöse Entzündung dieser Drüsen ist eine bislang kaum beschriebene Läsion, obwohl sie mit einer Häufigkeit von etwa 1 % bei Jungenten (Anas platyrhynchos) auftritt, aber offensichtlich nicht mit Erkrankung einhergeht und demnach weder klinisch noch bei der Schlachtung in Erscheinung tritt. In dieser Studie wurden neun veränderte Drüsen von acht Jungenten pathologisch-anatomisch und histopathologisch sowie bakteriologisch untersucht und die Ergebnisse mit 20 unveränderten Nasendrüsen verglichen. In allen Fällen war die granulomatöse Adenitis durch multifokale und konfluierende Granulome mit zentralem, vorwiegend aus heterophilen Granulozyten bestehendem Detritus, peripher gelegenen mehrkernigen Riesenzellen, Lymphozyten und Plasmazellen sowie interstitieller Fibrose gekennzeichnet, die zu einer knotenförmigen und derben Beschaffenheit des Organes führten. Im nekrotischen Zentrum zahlreicher Granulome fanden sich Haufen Gram-negativer Stäbchenbakterien, die als halotolerante *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* und *Aeromonas hydrophila* mikrobiologisch bestimmt wurden. Aus normalen Drüsen wurden ausschließlich verschiedene halotolerante Gram-positive Kokken, vor allem *Streptococcus* sp. und *Enterococcus* sp. isoliert. Die Verteilung der Läsionen und das Fehlen von systemischen Krankheitserscheinungen sprechen in hohem Maße für eine lokalisierte und aszendierende Infektion über den Ausführungsgang der Nasendrüsen und nicht für eine hämatogene Besiedelung dieses Organs als Folge einer Bakteriämie.

Wechselwirkung zwischen bakteriellen und viralen Infektionen am Modell Aeromonas salmonicida und Virale Hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforellen

Köllner, B.*, Stachowski, A., Kotterba, G., Bergmann, S.M., Fichtner, D. und Fischer, U.

Wechselwirkung zwischen bakteriellen und viralen Mischinfektionen in Regenbogenforellen

Es wurde ein Infektionsmodell zur Untersuchung der Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen in Forellen nach viraler (Virale Hämorrhagische Septikämie, VHSV), bakterieller (Aeromonas salmonicida salmonicida, A.s.s) und nach Mischinfektionen etabliert. Einflussfaktoren auf die Mortalitätskinetik und die Kontaktinfektionsrate, wie Infektionsdosis, Alter und genetische Abstammung der Forellen sowie Wassertemperatur werden charakterisiert.

Damit können die Modelle genutzt werden, um auf zellulärer und molekularer Ebene in vergleichenden Untersuchungen Immunmechanismen zu charakterisieren, die für die Resistenz gegen die Infektionen verantwortlich sind. Außerdem werden Untersuchungen zur Beobachtung, dass eine Infektion mit *A. salmonicida* eine erhöhte Resistenz gegen eine

nachfolgende VHSV-Infektion induziert, auf weitere virale Infektionen ausgeweitet. U. a. wurden Methoden etabliert, um aus Geweben sensitive Nachweise von A.s.s. bzw. VHSV mittels PCR zu führen.

Untersuchungen zur Antigen-Präsentation gegen Modell-Antigene (A.s.s., VHSV) bei der Regenbogenforelle

Krankheitserreger können sich intra- und extrazellulär im Organismus vermehren. Viren sind auf Komponenten der Wirtszelle angewiesen, um sich zu replizieren. Viele pathogene Bakterien vermehren sich extrazellulär. Auf diese Unterschiede muss das adaptive Immunsystem reagieren. Die Weichen dafür werden durch Präsentation antigener Peptide in MHC-Molekülen gestellt: Intrazelluläre Antigene werden über MHC I-Moleküle zytotoxisch aktiven $CD8^+$-T-Zellen präsentiert, während extrazelluläre Antigene nach Endozytose und lysosomalem Abbau in MHC II-Molekülen $CD4^+$-T_{helfer}-Zellen präsentiert werden. Die durch ihren Ko-Rezeptor charakterisierten $CD8^+$ Lymphozyten reagieren zytotoxisch gegen veränderte bzw. infizierte körpereigene Zellen. Die $CD4^+$ T_{Helfer}-Zellen sezernieren Zytokine, die B-Zellen zur Produktion von Ag-spezifischen Antikörpern anregen. Ob diese im Säugetiermodell bekannten Mechanismen bei den phylogenetisch älteren Fischen ebenfalls so ablaufen, wurde bei der Regenbogenforelle mit Hilfe von zwei Modell-Antigenen, dem VHSV und dem fischpathogenen Bakterium A.s.s, untersucht. Dabei sollte der Einfluss der Modell-Antigene auf die Expression der MHC-Moleküle, auch in Abhängigkeit von der Temperatur, gezeigt werden.

Bei der Untersuchung im Virusmodell wurde eine temperaturabhängige starke Zunahme von MHC I in den infizierten Zellen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen gemessen. Die Präsentation führt auch zu einer deutlichen zytotoxischen Reaktion von $CD8^+$ T-Zellen gegen virusinfizierte Zellen. Außerdem konnten wir zeigen, dass auch die humorale Immunität nach Infektion aktiviert wird.

Mit dem zweiten Modellantigen A.s.s. konnten wir zeigen, dass nach Immunisierung die Zahl MHC II-exprimierender Zellen (Monozyten, B-Lymphozyten) ansteigt. Diese Aktivierung ist unterhalb von 12°C allerdings stark gehemmt. Damit rückt die Frage in den Mittelpunkt, ob unzureichender Schutz nach Vakzinationen nicht auf temperaturbedingter unzureichender Aktivierung des Immunsystems durch supprimierte Antigenpräsentation beruhen kann.

Unterschiedliche zelluläre Immunreaktion in Regenbogenforellen nach Stimulation mit bakteriellen bzw. viralen Pathogenen

Die zelluläre Immunantwort nach Immunisierung mit inaktivierten A.s.s. bzw. nach *In-vitro*-Stimulation mit inaktiviertem VHSV wurde mit der zellulären Immunantwort nach Infektion mit VHSV bzw. A.s.s. vergleichend untersucht.

Nach i.p. Immunisierung mit A.s.s. wurde zuerst eine Stimulation der Milzleukozyten und danach der Blutleukozyten gemessen. B-Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten reagierten am stärksten. T-Zellen, charakterisiert als sIgM-Lymphozyten, zeigten keine Reaktion.

Die Immunisierung mit VHSV führte dagegen zu einer starken Stimulation von sIgM- TCR+ T-Lymphozyten, während B-Lymphozyten eine deutlich geringere Stimulation zeigten. Diese Stimulation der T-Zellen resultierte in einer spezifischen MHC I-restringierten zellvermittelten zytotoxischen Reaktion gegen VHSV-infizierte RTG 2-Zellen. Die Proliferation der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen nach Immunisierung mit bakteriellen bzw. viralen Antigenen ist für den Schutz vor einer Infektion wichtig. Das konnte in den Infektionsmodellen gezeigt werden. Nach A.s.s.-Infektion wurde in moribunden Fischen ein deutlicher Verlust von Monozyten, aber auch von TCR^+-Lymphozyten nachgewiesen. Dagegen zeigte sich in moribunden, VHSV-infizierten Fischen ein nahezu kompletter Verlust von $CD8^+$ T-Zellen. Das

deutet darauf hin, dass die Erreger Mechanismen entwickelt haben, um eine effektive Immunantwort zu unterdrücken.

3 ÜBERTRAGBARE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN

Etablierung und Anwendung von transgenen Mausmodellen zum Nachweis von TSE-Erregern

Buschmann, A.*, Pfaff, E., Reifenberg, K., 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 nun im Rahmen der am FLI durchgeführten BSE-Pathogenesestudie bei Rindern zur Untersuchung verschiedenster peripherer Organe BSE-infizierter Rinder eingesetzt werden. Bisherige Bioassays auf BSE-Infektiosität in den verschiedenen Körpergeweben und -flüssigkeiten konnten nahezu ausschließlich unter Verwendung konventioneller RIII-Mäuse durchgeführt werden, die eine deutlich geringere Sensitivität aufweisen. In diesem Zusammenhang wurden Tgbov XV Mäuse bereits mit Organhomogenaten eines klinischen BSE-Falls infiziert. Auf diese Weise werden bereits vor Ablauf der BSE-Pathogenesestudie erste Ergebnisse über den Erregergehalt in peripheren Organen vorliegen.

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 ($PrP^{ARQ/ARQ}$) des Schafes überexprimieren und damit ein geeignetes System zum Nachweis des Scrapie-Erregers darstellen, wurden im Rahmen eines von der Europäischen Union geförderten Forschungsprojektes hergestellt. Für das Prion-Protein des Schafes sind verschiedene, die Scrapie-Empfänglichkeit beeinflussende Polymorphismen an den Positionen 136, 154 und 171 bekannt. Das PrP^{VRQ}-Allel (wobei V für die Position 136, R für 154 und Q für 171 steht) geht einher mit der höchsten Empfänglichkeit, gefolgt vom PrP^{ARQ}-Allel. Dagegen scheint das PrP^{ARR}-Allel eine sehr geringe Empfänglichkeit bis hin zur Resistenz zu vermitteln. Dabei wurde neben einem DNA-Konstrukt, welches für das authentische ovine Wildtyp-PrP kodiert (Tgshp), auch ein Konstrukt für ein chimäres PrP aus murinen und ovinen Sequenzen verwendet (Tgmushp). Eine analoge Chimäre aus Rinder/Maus-Sequenzen (Tgmubo) hatte sich in der Vergangenheit als mit BSE und Scrapie nicht effizient infizierbar erwiesen (Inkubationszeiten > 600 Tage).

Aus Übertragungsstudien mit verschiedenen Scrapie- und BSE-Isolaten ging hervor, dass Schaf-PrP-transgene Mäuse (authentisches PrP und chimäres PrP) für diese Erreger ebenfalls hoch empfänglich sind. Hierbei waren die Inkubationszeiten in Tgmsuhp-exprimierenden Mäusen (chimäres PrP) etwas länger als in den Mauslinien, die authentisches ovines PrP exprimieren, trotzdem scheint die Empfänglichkeit dieser Mäuse höher zu sein als die nicht-transgener Mäuse oder die der Tga 20 Mäuse (diese Tiere überexprimieren das murine Prion-Protein).

Neben der Infektion mit primären Isolaten aus Wiederkäuern wurden die Schaf-PrP-transgenen Mäuse ferner mit drei Maus-passagierten Scrapiestämmen inokuliert. Dabei waren die Inkubationszeiten in den chimären Tgmushp-Mäusen kürzer als die in den Wildtyp-PrP-exprimierenden Tgshp-Mäusen. Nur in murines PrP überexprimierenden Tga20-Mäusen wurden deutlich längere Inkubationszeiten beobachtet, womit erneut die Bedeutung der Aminosäure-Sequenzhomologie bei Übertragungen deutlich wird.

Die gemäß der EU-Verordnung 999/2001 durchgeführten Übertragungsversuche zur Stammdifferenzierung der deutschen Scrapie-Isolate werden parallel in RIII-, C57BI- 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. Besonders zur Untersuchung der kürzlich erstmals beschriebenen atypischen Scrapiefälle auf das Vorhandensein von Infektiosität sind diese Tiere daher besonders gut geeignet und werden in entsprechenden Infektionsversuchen eingesetzt.

Verwendung transgener Mäuse zum Nachweis von Infektiosität in Proben von BSE-verdächtigen Rindern

Buschmann, A.*, Weber, A. und Groschup, M.H.

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. Insofern eignen sich diese Mäuse auch zur Abklärung von so genannten dissoziierten BSE-Fällen, d. h. BSE-Fällen, die in BSE-Schnelltests und in der Abklärungs-diagnostik abweichende Ergebnisse zeigen. Allerdings hat sich inzwischen gezeigt, dass solche so genannten dissoziierten BSE-Fälle entgegen den Erwartungen nicht vorkommen. Einige deutsche BSE-Fälle wurden zu Übertragungsstudien in Tgbov XV Mäuse herangezogen und es wurden Inkubationszeiten beobachtet, die denen aus früheren BSE-Übertragungsexperimenten in diesen Mäusen entsprachen.
Daneben wurde die PrP^C-Expression in nicht-neuronalen (z. B. lymphatischen) Organen der o. g. Mäuse analysiert. In Übereinstimmung mit der niedrigen Expression des bovinen PrP^C in der Milz der transgenen Mäuse fanden sich in den Milzen BSE-infizierter und/oder final erkrankter Mäuse nur ausgesprochen schwache PrP^{Sc}-Ablagerungen.
Ferner wurde der Einfluss der gleichzeitigen Expression von Wildtyp-Maus-PrP^C auf die BSE-Empfänglichkeit dieser Mäuse untersucht. Hierzu wurden Tgbov PrP-Mäuse (auf PrP-KO-Hintergrund) mit konventionellen Mäusen gekreuzt und anschließend Wildtyp-Mäuse, Tgbov-PrP-Mäuse und die Kreuzungstiere mit einem definierten BSE-Homogenat inokuliert. Hierbei ergab sich, dass sich die gleichzeitige Expression des Wildtyp-Maus-PrP^C und des bovinen PrP^C negativ auf die BSE-Empfänglichkeit der Tgbov-PrP-transgenen Mäuse auswirkt. In einem weiteren Experiment wurden Kreuzungstiere aus Tgbov XV Mäusen und RIII-Mäusen (diese zeigen nach BSE-Infektion die kürzesten Inkubationszeiten aller konventionellen Mausstämme) mit dem BSE-Erreger infiziert. Dabei wurden aus diesen Kreuzungen Tiere auf PrP-KO-Hintergrund und Tiere auf PrP-Wildtyp-Hintergrund infiziert. Dieser Versuch ist bisher nicht abgeschlossen und kann erst zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden.

Evaluierung therapeutischer Proteine: Vermehrung und Titration von Scrapie-Erregern aus Mäusen und Hamstern, Herstellungsverfahren therapeutischer Proteine

Buschmann, A., Weber, 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 hoch empfindlicher Infektiositätsassays ermittelt. Dadurch kann qualitativ und quantitativ bestimmt werden, ob während der üblicherweise verwendeten Aufreinigungsverfahren potenziell im Eingangsmaterial vorhandene Prionen entfernt werden oder ob es im Gegenteil gar zu einer Anreicherung in bestimmten Fraktionen kommen kann. Die in diesem Projekt notwendigen Tierversuche sind zum Berichtsdatum noch nicht abgeschlossen.

BSE- und Scrapie-Erreger-Differenzierung am Schafmaterial und im Mausmodell

Gretzschel, A.*, Weber, A., Buschmann, A., Junghans, F. und Groschup, M.H.

Eine wichtige Fragestellung innerhalb der BSE-Forschung ist, ob der BSE-Erreger auch in der Schaf- und Ziegenpopulation in Deutschland vorkommt. Eine Übertragung des BSE-Erregers auf Schafe konnte experimentell schon nachgewiesen werden, und im letzten Jahr wurde eine Übertragung des Erregers auf natürliche Weise auf eine Ziege in Frankreich veröffentlicht. Die Differenzierung zwischen BSE und Scrapie kann direkt am Schafmaterial oder im Mausmodell durchgeführt werden.
Für die Charakterisierung am Schafmaterial wurde an unserem Institut ein Test etabliert (FLI-Test), bei dem nach PTA Präzipitation des PrP^{Sc} und Western Blot die Glykosylierungsverhältnisse, das Molekulargewicht des unglykosylierten PrP und das Antikörperbindungsverhalten ermittelt werden. Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass keines der dreizehn deutschen klassischen Scrapie-Isolate biochemische Eigenschaften von BSE zeigte.
Für die Charakterisierung im Mausmodell wurden deutsche Scrapie-Feldisolate aus den Jahren 2002 und 2003 genotypisiert und in drei Wildtypmauslinien (RIII, VM95, C57BI6) und in eine transgene Mauslinie (Tgshp) inokuliert. Im Mausbioassay werden Inkubationszeiten und Übertragbarkeit der Isolate ermittelt. Am Mausmaterial werden histologische (Immunhistologie, Straintyping, PET-Blot) und biochemische (Glykosylierungsverhältnisse, Molekulargewichtsunterschiede, Proteinstabilität, Antikörperbindungsstudien) Untersuchungen zur Charakterisierung der Scrapie-Isolate durchgeführt.

Untersuchung der molekularen Mechanismen bei Erregervermehrung in der Zellkultur und in zellfreien Systemen

Eiden, M.*, Kupfer, L. Proft, J. und Groschup, M.H.

Prionenerkrankungen oder transmissible spongiforme Enzephalopathien sind charakterisiert durch eine strukturelle Veränderung (Konversion) des zellulären Prionproteins PrP^{C} in eine pathogene Form PrP^{Sc}. Im Vergleich zu PrP^{C} zeichnet sich PrP^{Sc} vor allem durch eine partielle Resistenz gegenüber Proteinase K (PK)-Verdau aus. Zusätzlich ist eine Aggregation der PrP^{Sc}-Moleküle und die Ausbildung von Fibrillen zu beobachten.
Um die Konversion genauer zu analysieren, wurde ein Assay etabliert, bei dem PrP^{C}-Moleküle zusammen mit gereinigten PrP^{Sc}-Aggregaten in einem geeigneten Probenpuffer inkubiert werden. Unter diesen Bedingungen kann allein PrP^{Sc} die Konversion von rekombinanten PrP^{C} in eine partiell PK-resistente Form PrP^{res} induzieren. Die Detektion des PrP^{res} erfolgt dabei mit spezifischen Antikörpern, die nur das neu konvertierte PrP^{res} erkennen. Murines PrP^{C} wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt und PrP^{Sc} aus Maus-passagierten Scrapie- bzw. BSE-

Stämmen isoliert. Drei verschiedene Scrapie-Stämme (Me7, 22A, 87V) und ein Maus-passagierter BSE-Stamm wurden für die Konversion von murinem PrP^C eingesetzt. Die Konversion wies in allen Fällen den gleichen zeitlichen Verlauf auf und erreichte ihr Maximum jeweils nach drei Tagen.
Mittels dieses zellfreien Tests konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Stämme ihre spezifische Konformation auch auf das neu konvertierte PrP^{res} übertragen können. Dies konnte durch das unterschiedliche Molekulargewicht der PK-resistenten PrP^{res}-Fragmente nachgewiesen werden: Das BSE-generierte Fragment ist etwa 1 kDa kleiner als das entsprechende Scrapie-Fragment. Doppelinkubationen mit zwei unterschiedlichen Stämmen resultierten in der Bildung von zwei unterschiedlich großen Fragmenten.
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, welches mit den *In-vivo*-Befunden übereinstimmt.
Auch die Effekte ganzer Domänen innerhalb des Prion-Proteins auf die Konversion soll näher analysiert werden. Dazu wurden N-terminal verkürzte Konstrukte des Prion-Proteins rekombinant hergestellt, die im zellfreien Assay konvertiert werden sollen. Dabei soll vor allem die Rolle des N-terminus bei der Konversion analysiert werden.
Schließlich wird in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kretzschmar (München) nach Substanzen gesucht, die die Konversion bzw. Aggregation des Prion-Proteins hemmen können. Dazu wird eine Substanzbibliothek mit 10.000 Substanzen verwendet, die von der Münchner Arbeitsgruppe mittels eines automatisierten Aggregations-Assays (SIFT-Assay) getestet wurde. Von den 73 Substanzen, die im SIFT-Assay einen inhibitorischen Effekt zeigten, wirkten auch 16 Substanzen als Inhibitoren der zellfreien Konversion. Diese Substanzen werden nun weiter auf ihre therapeutische Wirksamkeit hin analysiert. Zusätzliche Substanzbibliotheken sollen in Zukunft herangezogen werden, um weitere Inhibitoren zu finden.

Untersuchungen zur Prophylaxe und Therapie von Prion-Krankheiten in Zellkultur
Geissen, M.*, Oelschlegel, A. und Groschup, M.H.

Die Zellkultur eignet sich in besonderem Maße für die Untersuchung der Konversionsreaktion des Prion-Proteins, speziell für die Erforschung zellulärer Abläufe bei der Umfaltung von PrP^C zu PrP^{res}. Sie kombiniert die Schnelligkeit eines durch kurze Generationszyklen charakterisierten Systems mit den Vorteilen eines *„In-vivo"*-Modells und bietet somit die Möglichkeit, eine Selektion potenziell therapeutisch wirksamer Substanzen in einem relativ engen Zeitraum unter weitgehend physiologischen Bedingungen durchzuführen.
Im Rahmen dieser Fragestellung wurden zunächst drei mit Scrapie infizierte Zelllinien etabliert (ScN_2a, N_2a-Zellen mit RML infiziert; SMB, „Scrapie Mouse Brain" mit 22F bzw. RML infiziert) und charakterisiert (Stabilität der Infektion, Empfindlichkeit der Anzeige inhibierender Substanzen). In einem nächsten Schritt wurden die Zellkultursysteme auf das 96-well Plattenformat adaptiert, woraus die Möglichkeit erwuchs, parallel eine sehr große Anzahl von chemischen Verbindungen auf ihre konversionshemmende Wirkung zu untersuchen. Es wurde damit begonnen, 10.000 chemische Verbindungen aus einer Substanzlibrary (DIVERSet-Bibliothek, ChemBridge) in Zellkultur zu testen. Bisher konnten aus 7.600 getesteten 348 Substanzen ermittelt werden, die eine Hemmwirkung auf die Konversion von PrP^C zu PrP^{res} ausüben. Die chemische Struktur aller Substanzen mit konversionshemmenden Eigenschaften wird im Computermodell analysiert und auf ähnliche Strukturmerkmale hin untersucht. Die ermittelten Daten bieten die Basis für ein gezieltes Screening mit bestimmten Substanzgruppen/Pharmazeutika aufgrund ihrer Strukturmerkmale.

Im Anschluss an die Zellkulturstudie soll eine Applikation der Konversionsinhibitoren im Mausbioassay erfolgen.

Studien zur Infektion von Zelllinien mit unterschiedlichen TSE-Erregern
Oelschlegel, A*, Geissen, M. und Groschup, M.H.

2003 wurde zum ersten Mal gezeigt, dass sich Zellkultursysteme im Prinzip für die Bestimmung des Erregergehaltes einer Probe eignen (Klöhn et al.; PNAS; 2003). Hierbei ist der Aufwand an Zeit, Material und Versuchstieren deutlich geringer als bei der Erregertitration *in vivo*. Bisher ist es jedoch nur möglich, die Titration mit einer einzigen Zelllinie (N_2a) und einem einzigen Erregerstamm (RML) durchzuführen. Das Ziel dieser Studie ist es weitere Zelllinien zu identifizieren, die sich, aufgrund ihrer TSE-Empfänglichkeit, für Quantifizierungsassays eignen. In Zusammenarbeit mit der Zellbank (Dr. Riebe; FLI-Insel Riems) wurden neuronale Zelllinien aus transgenen Mäusen etabliert, die ovines bzw. bovines Prion-Protein auf einem PrP-„knock-out"-Hintergrund überexprimieren (Tgshp; Tgbov; Dr. Buschmann). Diese Linien wurden bis zum Status der Permanenz passagiert und die Expression des Transgens im Western Blot nachgewiesen. Darüber hinaus wurden weitere Zelllinien unterschiedlicher Spezies und Gewebetypen ausgewählt, wobei als Auswahlkriterien die Empfänglichkeit der Gewebe für TSE *in vivo* bzw. der Nachweis der PrP-Expression im Organismus dienten. Die Expression des Prion-Proteins in den Zelllinien wurde im Western Blot ermittelt. In ersten Versuchen wurden murine, bovine & ovine Zelllinien mit BSE, Scrapie bzw. Maus-passagierten TSE-Erregern inokuliert, um die generelle Empfänglichkeit der jeweiligen Zelllinien zu ermitteln. Aus TSE-sensitiven Linien sollen dann mittels Klonierung hoch sensitive Zellen herangezogen werden. Bisher gelang es, die Infektion einer bovinen Zelllinie mit BSE nachzuweisen. In weiteren Passagen verlor diese Linie jedoch das PrP^{res}.

TSE-Forschungsplattform: Erweiterung der nationalen BSE-Probenbank
Ziegler, U.*, Wachlin, G. und Groschup, M.H.

Die BSE-Gewebebank stellt weiterhin sicher, dass von jedem deutschen BSE-Fall entsprechendes Probenmaterial gesammelt wird und durch die verstärkte Nutzung der Proben aus der BSE-Pathogenesestudie eine breite BSE-Probenpalette, die nach standardisierten Methoden asserviert wurde, zur Verfügung steht.
Die nationale BSE-Probenbank umfasst neben verschiedenen Gewebeproben aller in Deutschland bis dato 357 BSE-positiv getesteter Tiere (Stand: 11.01.2005) auch eine umfangreiche Sammlung von Kohortentieren. Der Probenbestand aus den Rinderkohorten umfasst derzeit mehr als 60 vollständige Kohortensammlungen und mehr als 100 Teilkohorten. Dieses umfangreiche Teilarchiv (insgesamt mehr als 16.200 Einzelproben von ca. 5.200 Tieren) bietet einen ausgezeichneten Durchschnitt durch alle Kohorten von deutschen BSE-Fällen, so dass seit April 2004 auf die Sammlung weiterer Proben verzichtet wird.
Es war im Jahr 2004 trotz Verpflichtung der Landesbehörden leider nicht möglich, bei BSE-Verdachtsfällen über die normalerweise zur Durchführung der diagnostischen Abklärungsuntersuchungen einzusendenden Proben eine breitere Probenpalette, besonders Körperflüssigkeiten, in die nationale Gewebebank einzubringen. Deshalb bleibt die Zahl solcher Proben von klinisch BSE-positiven Rindern im Archiv bei zehn Tieren.
Die Dokumentation der Probenbank sowie der wissenschaftliche Austausch der Proben erfolgt nach der GLP-Richtlinie.
Seit dem nunmehr zweijährigen Verlauf der BSE-Pathogenesestudie (Start: 18.12.2002) konnte ein umfangreiches Teilarchiv an Proben von den infizierten Rindern sowie 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 genommen werden. Alle diese Materialien werden in das Archiv der nationalen BSE-Probenbank überführt, wobei eine computergestützte Datenbank und ein Etiketten-Barcodesystem die Archivierung und Lagerung der einzelnen Proben standardisiert. So konnten im Zeitraum von zwei Jahren mehr als 99.500 Einzelproben aus dem Tierversuch in die Sammlung eingebracht werden (Stand: 31.12.2004). Es handelt sich dabei um definiert präklinisches Material, welches besonders häufig angefragt wird (mehr als die Hälfte aller Anfragen an die TSE-Geschäftsstelle/BSE-Probenbank).
Im Rahmen der nationalen TSE-Forschungsplattform wird dieses Material auf Antrag Wissenschaftlern anderer Institute sowie der Industrie, die an Test- und Therapieverfahren arbeiten, zur Verfügung gestellt. Über die Gewebeabgabe entscheidet der interne wissenschaftliche Beirat der deutschen TSE-Forschungsplattform – eine Selbstorganisation der auf dem Prion-Gebiet wissenschaftlich tätigen deutschen Arbeitsgruppen.
Nach Anfrage bei der TSE-Geschäftsstelle und auf der Basis wissenschaftlicher Kriterien wurden im Jahr 2004 von der Probenbank 1.980 Einzelproben an 15 verschiedene TSE-Arbeitsgruppen (Antragsteller) versandt. Hierbei wurden neben Hirnstammproben, Körperflüssigkeiten bzw. DNA-Proben von BSE-positiven Tieren in sehr starkem Maße auch Proben, die im Rahmen der BSE-Pathogenesestudie generiert wurden, abgegeben.

TSE-Forschungsplattform: Durchführung einer BSE-Pathogenesestudie bei Rindern

Groschup, M.H.*, Ziegler, U., Weber, A., Diephaus-Borchers, C., Wagenschwanz, B., Hoffmann, C. und Buschmann, A.

Seit dem 18.12.2002 wird ein Tierversuch zur Erforschung der BSE-Pathogenese beim Rind durchgeführt. 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.
Seit Studienbeginn wurden 56 Kälber (2 x 28) aus einer ökologisch geführten Mutterkuhherde oral mit je 100 g eines Mazerates aus BSE-positivem Rindergehirn infiziert (Gruppe A Ende Januar 2003 und Gruppe B ein Vierteljahr später). Das dazu notwendige BSE-infizierte Hirnstammgewebe (~ 5,7 kg) wurde von britischen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt. 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. 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. Ausgewählte Proben, die auf diese Weise genommen wurden, werden anschließend in Übertragungsstudien in transgenen Mäusen eingesetzt, die das Rinder-PrP exprimieren. Aus vorangegangenen Experimenten ist bekannt, dass diese Mäuse mehr als 10.000mal 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 sollen 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. Hierzu wurde von Prof. U. Braun an der Universität Zürich ein spezieller Untersuchungsgang beschrieben, der neben der Körperhaltung und dem Bewegungsablauf auch die Reaktionen der Tiere auf optische, akustische und taktile Reize erhebt. Besonders bei Tieren mit nur schwacher oder untypischer Ausprägung der klinischen BSE-Symptomatik ist jedoch für eine verlässliche Einschätzung der Symptome ein erhebliches Maß an Erfahrung notwendig. Besonders zu Beginn der klinischen Erkrankungsphase treten unspezifische klinische Symptome auf.
Um bereits erste klinische Anzeichen einer beginnenden BSE-Erkrankung bei den experimentell infizierten Rindern sicher feststellen zu können, werden die Tiere alle acht Wochen nach einem festgelegten Untersuchungsschema nach Braun et al. beurteilt. Hierbei kommt neben der Beurteilung des Verhaltens auch die Beurteilung der Sensibilität (Prüfung auf Überempfindlichkeit auf Berührung, Manipulation an Kopf und Hals, Reaktion auf Lärm und Licht, Besenprobe) sowie die Beurteilung der Bewegung (Lahmheit/Ataxie) in die Bewertung.
Zum momentanen Zeitpunkt (Januar 2005) – 24 Monate nach Infektion der ersten Rinder – sind noch bei keinem Tier klinische BSE-Symptome aufgetreten. Die Versuche aus England zeigten, dass bei einer oralen Infektionsdosis von 100 g Hirnstammgewebe der Beginn der klinischen Symptome im Durchschnitt bei 32 Monaten p.i. liegt. Deshalb kann der Beginn der BSE-Klinik in unserem Tierversuch nicht vor Ablauf eines weiteren Jahres erwartet werden.
In Probenmaterial aus dem Darmbereich infizierter sezierter Rinder konnte mittels immunhistologischer und Immunoblot- (einschließlich Phosphorwolframsäurefällung) Untersuchungen pathologisches Prion-Protein nachgewiesen werden. Der 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 erfolgreich verlaufen ist. In Gewebeproben aus dem zentralen Nervensystem konnten bisher keine eindeutigen PrP^{Sc}-Ablagerungen nachgewiesen werden.
Die Untersuchungen der entnommenen Gewebeproben stehen jedoch erst am Anfang. Die im Rahmen dieses Versuchs zu einem definierten Zeitpunkt der Inkubationszeit entnommenen Gewebeproben sowie Proben von Körperflüssigkeiten sind für die Entwicklung und Evaluierung neuer BSE-Schnelltests von größter Bedeutung. Auch sogenannte Lebend-Tests, also Tests, die durch die Untersuchung von am lebenden Tier entnommenen Körperflüssigkeiten eine mögliche BSE-Infektion anzeigen sollen, können somit entwickelt und evaluiert werden. Tausende Proben wurden inzwischen den BSE-Lebend- und Post-Mortem-Testentwicklern zur Verfügung gestellt. Erste Ergebnisse aus deren Untersuchungen können optimistisch stimmen, bisher wurde allerdings das Stadium einer unmittelbar bevorstehenden praktischen Anwendung noch bei keinem Lebendtest erreicht.

Gewinnung von biologischen Ressourcen zur Identifizierung von Surrogat-Markern bei BSE

Brenn, A.*, Williams, J. und Groschup, M.H.

Obwohl bisher noch nicht gezeigt werden konnte, dass das Immunsystem an der Abwehr von TSE-Infektionen beteiligt ist, sind Zellen des Immunsystems in den Infektionsprozess eingebunden. Veränderungen im Proteinmuster von Zellen des Immunsystems könnten frühe Hinweise zum Nachweis von TSE-Infektionen in lebenden Tieren liefern. Immunzellen wurden aus Blutproben gewonnen, die im Rahmen der 2003 begonnenen BSE-Pathogenesestudie regelmäßig an lebenden Kontroll- und BSE-infizierten Tieren genommen werden und damit die

ideale Grundlage zur Identifizierung von frühen Markern für eine BSE-Infektion in Rindern liefern. Um die Rolle der verschiedenen Immunzellen in der Prion-Pathogenese genauer zu untersuchen, wurden aus EDTA-Vollblut periphere mononukleäre Zellen isoliert. Anschließend erfolgte immunomagnetisch mit Hilfe der magnetischen Zellsortierungsmethode (MACS) die Separation von CD21-positiven B-Zellen, CD4-positiven T-Zellen und CD14-positiven Makrophagen. Aus diesen Subpopulationen gewonnene Proteinextrakte sollen in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden, anschließend wird der computergestützte Vergleich der Proteinmuster zwischen Kontroll- und BSE-infizierten Tieren erfolgen. Parallel sollen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um John Williams vom Roslin-Institut in Edinburgh Genexpressionsprofile dieser Leukozytensubpopulationen mit Hilfe von DNA-Microarrays erstellt und mit den Proteomdaten verglichen werden.

Untersuchungen zur Pathogenese der BSE-Infektion bei Schafen

Hoffmann, C.*, Weber, A. 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 werden ovine PrP-überexprimierende transgene Mäuse gleichzeitig mit dem BSE- und dem Scrapie-Erreger infiziert. Die unterschiedlichen Tiergruppen erhalten dabei jeweils ein Gehirnhomogenat, das aus einem definierten Scrapie-Isolat und einem ovinen BSE-Isolat besteht.
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 des PrP^{Sc}. Nach Auftreten klinischer Symptome werden die Schafe euthanasiert und seziert, wobei ebenfalls Proben des lymphatischen Gewebes und ausgewählte nervale Strukturen des Kopfes entnommen werden.
Anhand der im Mausbioassay gewonnenen und der von den französischen Kollegen zur Verfügung gestellten Proben erfolgt der Nachweis von PrP^{Sc}, wobei bestimmt werden soll, ob eine BSE- oder Scrapie-Infektion vorliegt.

Studien zur Pathogenese bei Schafen nach alimentärer Infektion mit BSE- und Scrapie-Erregern (SC-Gut)

Hoffmann, C.*, Schultz, J. 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. Hierzu 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 Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger 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 wird nun mit ausgewählten Proben des Infektionsversuches eine definierte Anzahl Mäuse inokuliert.

Identifizierung von Modulatoren bei der Prion-Infektion
Wachlin, G.*, Brenn, A. und Groschup, M.H.

Mit Hilfe zweidimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese sollen Unterschiede im Proteinexpressionsmuster von Scrapie-infizierten und nicht infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Identifizierung der Proteine erfolgt mittels MALDI-ToF.
Im Rahmen dieser Proteomforschung werden gegenwärtig folgende Aspekte bearbeitet:

1. Durch den Vergleich der Proteinexpressionsmuster von mit PrP^{Sc} infizierten und nicht infizierten Zellen sollen Proteine identifiziert werden, die an der Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} beteiligt sind und/oder eine Voraussetzung für die Empfänglichkeit einer Zelle für PrP^{Sc} darstellen.
2. Im zweidimensionalen Immunoblot soll das PrP-Profil von N2a- und ScN2a-Zellen sowie von Gehirnproben von BSE-Rindern, Scrapie-Schafen und experimentellen Maus-Scrapie-Stämmen untersucht werden.

Nachweis und Bestimmung der Überlebensfähigkeit von BSE-Erregern in Nahrungsmitteln und in der Umwelt
Groschup, M.H.* und Ziegler, U.
(in Zusammenarbeit mit der Ludwig-Maximilians-Universität München, der TU München und der Bundesanstalt für Fleischforschung [BAFF])

Das bearbeitete Teilprojekt 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.

Neuroprion: Prävention, Behandlung, Management und Risikoanalyse der Prion-Erkrankungen (Network of Excellence, NoE)
Groschup, M.H.*, Eiden, M., Buschmann, A., Weber, A. und Ziegler, U.

Ziel dieses Netzwerks ist die Strukturierung und Integration der Forschungsanstrengungen der wichtigsten europäischen Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der Prion-Forschung. Das

gemeinsame Forschungsprogramm beinhaltet Forschungsarbeiten zur Prävention (einschl. Diagnose und Dekontamination), Kontrolle (Epidemiologie, Standardisierung), Behandlung (Entwicklung neuer therapeutischer Strategien) und zum Risiko-Management (einschl. Analyse) der TSE-Erkrankungen. Im Bereich der Diagnostik werden schwerpunktmäßig Methoden zur Differenzierung von Prion-Stämmen (mit dem Fokus auf BSE-Infektionen bei Mensch und Tier) und neue diagnostische Methoden für die Transfusionsmedizin (mit einem Schwerpunkt auf Surrogat-Markern) bearbeitet. Der Leiter des INNT koordiniert die Aktivitäten der wichtigsten Europäischen Gewebebanken von TSE-infizierten Tieren. Im Rahmen des Neuroprion NoE stellt das INNT den anderen Arbeitsgruppen Proben von den Rindern aus der BSE-Pathogenesestudie zur Verfügung. Darüber hinaus ist es in die Forschungsarbeiten zur TSE-Erreger-Differenzierung, zum Nachweis möglicher Modulatoren bei den Prion-Infektionen, zur Dekontamination von Prion-Erregern und zur Entwicklung neuer Zellkultur-Modelle zur Vermehrung, zum Nachweis und zur Charakterisierung der Prion-Erreger involviert.

Enzymatische Abnahme von Prion-Erregern
Groschup, M.H.*, Buschmann, A., Weber, A. und Ziegler, U.

In diesem Projekt wird die Effizienz von Keratinase im Hinblick auf die BSE-Erregerinaktivierung in bovinem Hirnstammgewebe untersucht. Es soll getestet werden, ob die biochemisch ermittelte Abnahmerate um den Faktor 10^5 auch mittels Bioassay-Verfahren bestätigt werden kann. Da dem Verdau auch eine Erhitzung auf 115°C vorangestellt ist, soll auch dessen Effekt auf die BSE-Erreger ermittelt werden. Die Erregertiter sollen mittels der transgenen, bovines PrP^C exprimierenden Mäuse ermittelt werden.

Untersuchung der Ursachen des BSE-Geschehens in Deutschland
Pottgießer, C.*, Conraths, F.J., Kroschewski, K., Klöß, D., Kämer, D., Teske, K. und Selhorst, T.

Der Kenntnisstand über die Ursachen der BSE-Verbreitung ist unzureichend. So ist weiterhin unklar, auf welchen Wegen Rinder in Deutschland mit BSE infiziert wurden. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung (IBEI) der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, dem Institut für Tierernährung (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) sowie der Klinik für Rinder (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) und verschiedenen Instituten der Ludwig-Maximilians-Universität München (IBE Lehrstuhl für Epidemiologie, Klinik für Wiederkäuer, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung) sollen Aufschlüsse über die Infektionswege der BSE in Deutschland gewonnen werden. Das Forschungsprojekt setzt sich aus drei Teilprojekten (Teilprojekt A: Basiserhebung zur Rinderhaltung, Teilprojekt B: Fall-Kontroll-Studie, Teilprojekt C: Risk Assessment Bayern) zusammen. Über die Basiserhebung zur Rinderhaltung sollen in den drei beteiligten Bundesländern (Bayern, Niedersachsen, Schleswig-Holstein) umfangreiche Daten zur Haltung und Fütterung in Rinder haltenden Betrieben gesammelt werden. Diese sollen miteinander verglichen werden und auch den über die BSE-Fall-Datenbank zur Verfügung stehenden Haltungs- und Fütterungsdaten von BSE-betroffenen Betrieben zum Zweck der Hypothesengenerierung gegenüber gestellt werden. Die gesamte Durchführung des Teilprojektes A für das Land Schleswig-Holstein liegt in der Verantwortung des FLI. Zur gezielten Überprüfung von Hypothesen zur BSE-Entstehung dient die Durchführung der Fall-Kontroll-Studien nach einheitlichem Muster. Unsere Beteiligung

liegt in der Aufbereitung und Bereitstellung der Kontrolldaten. Ebenso unterstützen wir das Teilprojekt C (Risk Assessment Bayern) durch Hilfe in der Modellierung. Nach Abschluss des Projektes sollen die im Rahmen des Teilprojektes A gesammelten umfangreichen Daten im Institut für Epidemiologie archiviert werden und auch zur Beantwortung anderer Fragen zur Verfügung stehen.

Etablierung Reportergen-markierter infektiöser Prion-Proteine

Baumgartner, A., Wienhold, D., Fuchs, C., Arzt, C., Büttner, M., Pfaff, E.*

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems, zu welchen u. a. die Creutzfeld-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 sowie die Expression und anschließende Konversion zu markierten Prion-EGFP-Fusionsproteinen.
Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene Prion-EGFP-Fusionskonstrukte hergestellt (230e+, 32e+, 93e+).
Mit Hilfe dieser Konstrukte gelang es, rekombinante Baculoviren zu erzeugen, 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.

Einfluss einer Ultra-Hochdruckbehandlung auf die Infektiosität von Prion-Proteinen

Voigt, H., Büttner, M., Wienhold, D., Csacko, U. und Pfaff, E.*
(in Zusammenarbeit mit Heindl, P., Fernandez Garcia, A., Butz, P., Trierweiler, B., Tauscher, B., BFEL Karlsruhe)

Transmissible spongiforme Enzepahlopathien (TSE) werden durch eine fehlgefaltete Isoform (PrP^{sc}) des zellulären Prionproteins (PrP^{C}) ausgelöst. Die hohe Stabilität gegenüber Erhitzung und mikrobiellem Abbau des pathogenen Prionproteins stellt ein großes Problem für dessen Inaktivierung dar. Geeignete Inaktivierungsmethoden, wie z. B. Autoklavieren bei 133 °C für 20 min, Behandlung mit konzentrierter Natronlauge oder starken Oxidationsmitteln sind aggressiv und führen zu einem starken Verlust an Qualität und Textur des zu behandelnden Materials. Ein milderes Verfahren zur Reduktion der Infektiosität und Stabilität von Prionen stellt dagegen eine Hochdruckbehandlung dar.
Zur Untersuchung einer möglichen Denaturierung von Proteinase K (PK) resistentem PrP^{sc} mittels Hochdruck wurden Gehirne von Hamstern, die mit dem Scrapiestamm 263K infiziert wurden, Drücken von 1 bis 10 kbar ausgesetzt. Zur Ermittlung der Denaturierungskinetik sind die infektiösen Proben mit verschiedenen Kombinationen von Druck, Temperatur und Zeit behandelt worden. Die druckbehandelten Proben wurden dann mittels Immuno-Western Blots auf ihre PK-Resistenz hin untersucht. Um Aussagen über den Einfluss dieser Behandlung auf die Infektiosität machen zu können, wurden zudem Tierversuche durchgeführt.
Es konnte in Immunoblots von Gehirnhomogenaten Scrapie-infizierter Hamster gezeigt werden, dass eine Behandlung mit 8 kbar und 60 °C für unterschiedliche Zeit (1 s, 5 min, 30 min, 120 min) in PBS dazu führte, dass das PrP^{sc} PK-sensitiv wurde. Diese Ergebnisse konnten im Tierversuch bestätigt werden. Nach einer 30-minütigen Druckbehandlung in PBS-Puffer ist eine Reduktion der infektiösen Einheiten pro Gramm Gehirn von 5 $\log_{10}$ zu

beobachten, nach einer zweistündigen Behandlung findet sogar eine Reduktion um 7 log_{10}-Einheiten statt. Bereits während der Druckaufbauphase (120 s) wird ein Teil des infektiösen PrP^{Sc} unschädlich gemacht, in diesem Fall war eine Titerreduktion um 3 log_{10}-Einheiten zu beobachten. Diese druckinduzierte Änderung der Proteinkonformation des nativen PrP^{sc} bzw. PrP27-30, die zum Verlust der PK-Resistenz und zu einer Reduktion der Infektiosität führt, wurde in allen getesteten neutralen Puffern und in Wasser bestätigt. Werden die infektiösen Proben in Puffern mit leicht saurem pH-Wert dem hohen Druck ausgesetzt, behält das PrP^{Sc} dagegen seine PK-Resistenz.

Monoklonale Antikörper gegen das pathologische Prion-Protein

Petsch, B., Pfaff, E., Planz, O., Rziha, H.-J. und Stitz, L.*

Bisher generierte monoklonale Antikörper (mAK) gegen Prion-Proteine sind nicht in der Lage, eindeutig zwischen dem physiologischen PrP^{c} und dem pathologischen PrP^{sc} zu unterscheiden. Hierdurch wird die Diagnostik von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien erheblich erschwert, da eine Unterscheidung zwischen normalen zellulären PrP und dem krankheits-assoziierten PrP nur über einen Verdau mit Proteinase K erfolgen kann. Zur Induktion der gewünschten Antikörper wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zunächst erfolgte eine Immunisierung mit Wolframsäure-gefällten murinen Prion-Proteinen. Durch die Wolframsäure kommt es zu einer spezifischen Anreicherung von PrP^{sc}. Nach einem Verdau mit Proteinase K werden zusätzlich unerwünschte zelluläre Proteine abgebaut, so dass ein angereichertes und vorgereinigtes Antigen vorliegt. Mit diesem Antigen wurden $PrP^{0/0}$ Mäuse immunisiert. Diese besitzen kein körpereigenes Prion-Protein und sind deshalb, im Gegensatz zu Wildtypmäusen, nicht immunologisch tolerant gegen das PrP^{c}. Auf diese Weise immunisierte Mäuse wurden für Zellfusionen zur Generierung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Die Kulturmedium-überstände der auswachsenden Hybridome wurden zunächst in einem ELISA-System auf ihre Reaktion gegen rekombinantes murines Prionprotein getestet. Durch diesen ELISA konnten drei monoklonale Antikörper identifiziert werden, die sowohl PrP^{c} als auch PrP^{sc} in der Western Blot-Analyse detektieren. Diese drei Antikörper reagieren zum Teil ebenfalls mit dem PrP von verschiedenen Säugetierspezies, darunter Hamster, Schaf und Rind. Bei diesem Western Blot zeigen die drei Antikörper unterschiedliche Reaktionsmuster mit dem PrP^{c} der verschiedenen Tierspezies. Dies deutet darauf hin, dass diese drei Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen. Die Hybridomüberstände dieser Fusionen wurden auch in einem neu etablierten ELISA auf ihre Reaktion gegen Gehirngewebe von gesunden und Scrapie-erkrankten Mäusen untersucht, in dem die Reaktionsweise von Antikörpern gegen normales und PrP^{sc} haltiges Hirngewebe verglichen wird und so PrP^{sc}-spezifische mAKs identifiziert werden sollen. Bei der Durchmusterung der Hybridomüberstände konnte jedoch kein entsprechend reagierender Antikörper gefunden werden. In einer weiteren Immunisierung wurden $PrP^{0/0}$ Mäuse mit hochdruckbehandeltem 263 K Hamsterscrapie-Material immunisiert. Aus diesen Fusionen ergaben sich im ELISA mit Hamsterhirngewebe zwei PrP-spezifische mAK. Bei der Untersuchung aller Hybridomüberstände der Fusionen mit Hamster PrP in dem oben genannten Maus-ELISA wurden keine kreuzreagierenden Antikörper gefunden. Gegenwärtig laufende Immunisierungen beruhen vor allem auf der Tolerisierung von Mäusen gegen das PrP^{c} und anschließender Immunisierung mit PrP^{sc}-haltigem Material. Weiterhin erfolgt der Einsatz verschiedener T–Hilfe induzierender Adjuvantien sowie unterschiedlicher Antigenpräparationen von PrP^{sc}.

Experimentelle Untersuchungen zur Resistenz und Empfänglichkeit von Schafen gegenüber dem Scrapieerreger

Klevenz, B., Petsch, B., Pfaff, E.* und Stitz, L.
(in Zusammenarbeit mit Geldermann, H. und Preuss, S., Universität Stuttgart-Hohenheim)

Beim Schaf treten bestimmte Allele des PrP-Gens mit Scrapie assoziiert auf. Dass Schafrassen mit hohen Frequenzen für Allele, die zur Resistenz gegenüber Scrapie führen sollten, gleichzeitig hohe Inzidenzen von Scrapie zeigen, wirft jedoch neue Fragen auf.
In diesem gemeinschaftlichen Projekt werden mehrere neue DNA-Positionen im und flankierend zum PrP-Gen einbezogen, die einfach darstellbar und hoch polymorph 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. Zu diesem Zweck wurden 120 Schafe, die sich hinsichtlich der neuen PrP-Genotypen maximal unterscheiden, oral mit Gehirnmaterial an Scrapie erkrankter Schafe inokuliert. 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 TSE-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. Die Studie dient der Analyse der Erregerausbreitung, der Bewertung von Scrapie-Tests, der Analyse der Infektiosität von Gewebematerial infizierter Tiere und der Analyse von Geneinflüssen auf die Pathogenese.

Untersuchungen zur Beteiligung von T-Zellen an der TSE-Pathogenese

Klevenz, B., Pfaff, E.*, Planz, O., Rziha, H.-J. und Stitz, L.

Nach experimenteller Inokulation von Versuchstieren, aber auch bei natürlichen Fällen von TSE kann das pathologische Prion-Protein in lymphoretikulären Organen wie Mesenteriallymphknoten, Peyer'schen Platten oder der Milz nachgewiesen werden. Die Beteiligung unterschiedlicher Zellen des Immunsystems an der Pathogenese von Prionenerkrankungen konnte gezeigt werden. So sind die follikulären dendritischen Zellen (FDCs) wichtig für die PrP^{Sc}-Replikation und -Akkumulierung in der Milz, B-Lymphozyten wiederum liefern wichtige Faktoren für Reifung und Funktion von FDCs. Informationen über den Einfluss der T-Lymphozyten auf die TSE-Pathogenese sind bisher sehr dürftig. Um die Rolle der verschiedenen T-Zellen in der Prion-Pathogenese genauer zu untersuchen, wurden Spendermäuse mit einem Gehirnhomogenat eines Maus-adaptierten RML-Prionenstammes intraperitoneal inokuliert. Die inokulierten Mäuse wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion getötet. Nach Isolierung der Splenozyten wurden die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen mit Hilfe der magnetischen Zellsortierungsmethode (MACS) angereichert. In ersten Experimenten entwickelten alle Tiere, denen Lysate von isolierten T-Zellen RML-inokulierter tga20 Mäuse übertragen wurden, eine spongiforme Enzephalopathie. Die mittels MACS angereicherten T-Zell-Subpopulationen wurden in der präparativen Durchfluss-zytometrie (FACSorter) weiter gereinigt. Die Reinheit der einzelnen Populationen wurde danach wiederum in der analytischen Durchflusszytometrie (FACS) überprüft. Nach intracerebraler Inokulation von Indikatormäusen mit Lysaten dieser T-Zell-Subpopulationen, die äquivalente Anzahlen $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen enthielten, zeigten alle Tiere wiederum die typischen Symptome einer Scrapieerkrankung. Dabei wurde nach Inokulation von $CD8^+$ T-Zell-Lysaten im Vergleich zur Inokulation mit $CD4^+$ T-Zell-Lysaten eine verlängerte

Inkubationszeit beobachtet. Die Western Blot Analyse von Gehirnen terminal kranker tga20 Empfängertiere bestätigte die Anwesenheit des pathologischen Prion-Proteins PrP^{Sc}. Diese Daten weisen darauf hin, dass $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen an der Pathogenese der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien beteiligt sind, indem sie möglicherweise PrP^{Sc} transportieren oder enthalten.

PrP^{Sc}-induzierte Änderungen zellulärer Genexpression

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

Peripherer Kontakt mit pathologischem Prion-Protein (PrP^{Sc}) führt nach längerer Inkubationszeit zu einer neurodegenerativen Erkrankung, der transmissiblen spongiformen Enzephalophatie (TSE), die mit der Bildung und Akkumulierung von PrP^{Sc} im ZNS korreliert und nach Aktivierung von Astrozyten/Mikroglia und Vakuolenbildung letztlich zum Verlust neuraler Zellen führt. Dieses Projekt nutzt das PrP^{Sc}-Mausmodell, um Veränderungen zellulärer Faktoren im Verlauf einer TSE-Erkrankung, insbesondere während des präklinischen Stadiums, zu untersuchen. Mäuse – die Wildtypstämme CD-1, C57/Bl6 sowie der transgene, PrP^{C} überexprimierende Stamm tga20 – wurden mit PrP^{Sc} (RML) intracranial (i.c.), intraperitoneal (i.p.) und oral infiziert. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion bis zum terminalen Krankheitsstadium wurden die Tiere getötet und Gehirn, Lymphknoten, Milz, Tonsillen, Darm, Knochenmark, Thymus sowie Blut für histologische, immunhistochemische, PET-Blot- und molekularbiologische Untersuchungen entnommen. Nach i.c. und i.p. Infektion der tga20 Mäuse fanden sich erst im terminalen Krankheitsstadium im Gehirn spongiforme Veränderungen sowie Astrozytose (GFAP-Nachweis) und Mikrogliose, in keinem Fall aber zu einem früheren Zeitpunkt der Infektion. Auch sind, verglichen zu infizierten Wildtyp-Mäusen, diese neurodegenerativen Veränderungen im Endstadium der Krankheit deutlich geringer. Dagegen weisen i.c. oder i.p. infizierte Wildtyp-Mäuse schon zu einem früheren, präklinischen Stadium deutliche spongiforme Veränderungen und Astrozytose im Gehirn ohne Anzeichen einer klinischen Erkrankung auf. Die weiteren Untersuchungen sollen aufklären, welche Rolle der Bildung von PrP^{Sc} bei der Neurotoxizität und der Induktion entzündungsähnlicher Faktoren zukommt. Genauere Kenntnis der Veränderungen zellulärer Genexpression im Verlauf einer TSE-Erkrankung ist nicht nur zum Verständnis zugrunde liegender Pathomechanismen wichtig, sondern kann auch neue Wege der Diagnose und Therapie ermöglichen. Hierzu wurden zwei verschiedene "gene array" Analysen etabliert, um transkriptionelle Änderungen zellulärer Genexpression zu bestimmen: **(a)** Filter (Sigma-Genosys) mit 531 Mausgenen und Hybridisierung mit radioaktiv-markierter cDNA erlauben die gezielte Untersuchung von funktionellen Gengruppen, **(b)** Bestimmung umfassender Genexpressionsprofile (15.000 Gene) durch den Einsatz von "mouse gene chips" (Turku, Finnland) und farb-markierter mRNA.

4 PARASITEN

4.1 *Neospora caninum*

Schares, G.*, von Blumröder, D., Klöss, D., Schröder, R., Staubach, C., Ziller, M. und Conraths, F.J.

Die Neosporose zählt weltweit zu den am häufigsten diagnostizierten Ursachen für Rinderaborte. Der Hund ist Endwirt für den protozoären Erreger *Neospora caninum*, kann aber wie auch das Rind Zwischenwirt sein und an einer *N. caninum*-Infektion erkranken. Der Hund als Endwirt kann im Kot Oozysten ausscheiden, die in der Umwelt längere Zeit überlebensfähig sind und wahrscheinlich durch Kontaminationen des Futters oder des Trinkwassers zu Infektionen bei Rindern 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.

Erfassung der Neospora-caninum-Seroprävalenz in rheinland-pfälzischen Rinderherden, die der Milch- und Fleischgewinnung dienen.

Um die *Neospora-caninum*-Seroprävalenz in Milchvieh- und Mutterkuhherden zu schätzen, wurde in Zusammenarbeit mit dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz und dem Landeskontrollverband Rheinland-Pfalz e.V. eine Querschnittsstudie in Rheinland-Pfalz durchgeführt. Diese im Rahmen eines EU-Projekts 2003 begonnene Studie wurde 2004 abgeschlossen. Aus der Gesamtheit der dem Landeskontrollverband Rheinland-Pfalz e.V. angeschlossenen Milchviehbetriebe (n = 2.082) wurden 100 zufällig zur Teilnahme an dieser Studie ausgewählt. Einzelmilchproben von insgesamt 4.343 Kühen wurden entnommen. Die Milchproben wurden mit Hilfe eines zuvor für die Untersuchung von Milchproben modifizierten und evaluierten ELISA untersucht. Die Gesamtprävalenz im Milch-ELISA lag bei 4,0 % (172/4.343). Die Prävalenzen innerhalb der Milchviehherden lagen zwischen 0 % und 42,9 %. 35 % (35/100) der Herden hatten eine Prävalenz von ≥ 5 %. Bei 15 % (15/100) der Herden lag die Prävalenz innerhalb der Herde ≥ 10 %.

Im Rahmen der Untersuchungen auf Antikörper gegen das Bovine Herpesvirus Typ 1 und das Bovine Leukose Virus wurden von den am Landesuntersuchungsamt Koblenz eingehenden und von Mutterkuhherden stammenden Serumsätzen 106 willkürlich ausgewählt. Die Proben wurden im ELISA auf Antikörper gegen *N. caninum* untersucht. Die Gesamtprävalenz im Serum-ELISA lag bei 4,9 % (131/2.680). Die Prävalenzen innerhalb der Mutterkuhherden lagen zwischen 0 % und 54,5 %. 37 % (39/106) der Herden hatten eine Innerherdenprävalenz von über 5 %, bei 21 % (22/106) der Herden lag sie über 10 %.

Der Anteil der Milch- bzw. Mutterkuhherden mit Prävalenzen von über 5 % lag im Regierungsbezirk Rheinhessen/Pfalz bei 54,6 % bzw. 50,0 %, im Regierungsbezirk Koblenz bei 39,0 % bzw. 41,8 %, und im Regierungsbezirk Trier bei 27,1 % bzw. 24,3 %.

Nachweis von Neospora-caninum-Oozysten bei natürlich infizierten Hunden

Von 11.586 Hundekotproben, die zwischen März 2001 und Februar 2004 an zwei in Baden-Württemberg liegende private veterinärmedizinische Untersuchungslabors (Tierärztliches Labor Freiburg, Vet-Med-Labor) gesendet worden waren, enthielten 31 (0,27 %) Oozysten, die morphologisch denen von *Hammondia heydorni* und *N. caninum* ähnelten. Die Oozysten-Isolate von vierzehn Hunden wurden weiter untersucht und zur Speziesbestimmung in Gerbils (*Meriones unguiculatus*) inokuliert. Fünf Isolate induzierten in Gerbils eine spezifische Antikörperantwort gegen Antigene von *N. caninum*-NC-1-Tachyzoiten, d. h. diese Isolate enthielten *N. caninum*. Bei keinem der Isolate wurden spezifische Reaktionen gegen

Toxoplasma gondii beobachtet. Die restlichen Isolate induzierten weder eine Antikörper-Antwort gegen *N. caninum* noch gegen *T. gondii*.

EU-Ringversuch zur Evaluierung und Standardisierung von Aviditäts-ELISAs zum Nachweis akuter Neospora-caninum-Infektion beim Rind
Im Rahmen eines von der EU geförderten Projekts wurden alle europaweit existierenden Aviditäts-ELISA-Verfahren zum Nachweis akuter *N.-caninum*-Infektion mit Hilfe von Feldseren und Seren experimentell infizierter Tiere verglichen. 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. Der Vergleich der Tests ermöglicht es, die bestehenden Tests weiterzuentwickeln und zu verbessern.

Weitere Projekte

Studien zur geographischen Verteilung von N. caninum-Infektionen und möglicher Risikofaktoren
Schares, G.*, von Blumröder, D., Klöss, D., Schröder, R., Staubach, C., Ziller, M. und Conraths, F.J.

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.*

Serologische Kreuzreaktivität zwischen N. caninum und den Hammondia-Arten des Fuchses und des Hundes
Meyer, J.*, Conraths, F.J. und Schares, G.

Entwicklung von Methoden zum Nachweis von N. caninum bei abortierten Rinderföten
Schares, G.*, von Blumröder, D. und Conraths, F.J.

Studien zur Rolle von N. caninum als Aborterreger beim Rind
Schares, G.*, von Blumröder, D. und Conraths, F.J.

Untersuchungen zu protozoär bedingten Reproduktionsverlusten bei landwirtschaftlich genutzten Wiederkäuern
Schares, G.*, von Blumröder, D. und Conraths, F.J.

4.2 *Echinococcus multilocularis*

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 im Dünndarm wenige bis zu mehreren 100.000 geschlechtsreife, 1-3 mm kleine Bandwürmer und scheiden die auch für den Menschen infektiösen Eier mit der Losung aus. Diese bleibt über Monate an der bodennah wachsenden Vegetation infektionsfähig. Natürliche Zwischenwirte sind Nager, die sich durch orale Aufnahme der Eier infizieren und das Larvenstadium in nahezu allen Fällen in der Leber beherbergen. Der Lebenszyklus schließt sich über die Räuber-Beute-Beziehung der End- und Zwischenwirte. Der Mensch infiziert sich als Fehl-Zwischenwirt.
Es ist erst seit etwa zehn Jahren bekannt, dass dieser Parasit bundesweit bei Füchsen vorkommt. Hinweise auf eine deutliche Zunahme von infizierten Füchsen (absolut und/oder relativ) verdichten sich seit einigen Jahren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies zu einem erhöhten Infektionsrisiko bei Menschen führt, das jedoch aufgrund der langen Inkubationszeit (5 – 15 Jahre) erst mit jahrelanger Zeitverzögerung zu einem Anstieg der Erkrankungszahlen führen würde. Im Vorsorgeprinzip ist daher von einem solchen Zusammenhang auszugehen. Als potenzielles 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 epidemiologisches Neuland. Dies ist daher 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 und zunehmend auch Marderhunde (Einsendungen durch Unterstützung aus verschiedenen anderen Projekten) bilden den 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 endemischen Nordwesten Brandenburgs beschrieben werden. Die Prüfung ihrer Gültigkeit auch außerhalb dieser Region ist ein 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 endemischer 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 *Trichinella spiralis*

Jung, D. und Mundt, E.*

Der Nachweis einer Infektion mit *Trichinella spiralis* erfolgt in Deutschland mittels des direkten Erregernachweises. Dabei ist aus epidemiologischer Sicht zu beachten, dass die Trichinellose zu der Gruppe 1 der zu bekämpfenden Zoonosen gehört. In Deutschland erfolgte seit vielen Jahren kein *Trichinella*-Nachweis in den Hausschweinebeständen und selten in Wildschweinen. Deshalb wird eine serologische Überwachung der Hausschweinebestände mit dem Ziel der Etablierung eines Zertifizierungssystems für Schweinebestände in Erwägung gezogen. Dieses System würde dann von Hygienemaßnahmen begleitet. Dieser indirekte Nachweis könnte mittels Nachweis von *Trichinella*-spezifischen Antikörpern im ELISA erfolgen. Um die Nutzung von Extrakten aus Trichinellalarven bzw. von natürlichen exkretorisch-sekretorischen Antigenen zu umgehen, wurde das Gen eines exkretorisch-sekretorischen Antigens in einem heterologen System in zwei Formen exprimiert. Das als Fusionsprotein mit dem GST-Protein exprimierte und anschließend mit Affinitätschromatographie gereinigte Antigen zeigte unspezifische Reaktivitäten mit Seren von Schweinen, die nicht mit *Trichinella spiralis* infiziert waren. Im Gegensatz dazu zeigte das mit einer His-Sequenz versehene und gereinigte Antigen im ELISA keine unspezifischen Reaktionen mit Seren nicht-infizierter Tiere. Da nicht mit allen Seren experimentell infizierter Schweine eine positive Reaktion zu beobachten war, werden weitere Gene exkretorisch-sekretorischer Antigene exprimiert und auf ihre Nutzbarkeit zum Antikörpernachweis hin untersucht.

4.4 *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 eingesendet und dort typisiert werden.

5 PATHOPHYSIOLOGIE UND LUNGENFUNKTIONSDIAGNOSTIK

Lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen zu den funktionellen Konsequenzen einer Chlamydien-Infektion beim Schwein

Reinhold, P.*, Jäger, J., Melzer, F. und Sachse, K.

Ziel der Untersuchungen war es, den Einfluss chlamydialer Infektionen auf die Lungenfunktion beim Schwein zu untersuchen. Acht Schweine (Alter: 39 bis 44 Tage) wurden in eine Studie zur aerogenen Infektion mit Chlamydien eingeschlossen (vier Tiere wurden inhalativ mit *Chlamydia suis* infiziert, vier fungierten als nicht-infizierte Kontrolltiere). Weitere 19 Schweine - zwar klinisch gesund, aber bei gezielten PCR-Untersuchungen teilweise positiv für das Vorhandensein von *Chlamydiaceae* - wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten untersucht (zwischen der 5. und der 27. Lebenswoche).
Mit Hilfe des Verfahrens der Impuls-Oszilloresistometrie erfolgten an allen 27 Tieren wiederholte lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen (n = 465 Lungenfunktionstests). Folgende Kenngrößen der Lungenfunktion wurden ermittelt: ventilatorische Parameter zur Beschreibung der Lungenbelüftung (Atmungsfrequenz, Atemzugvolumen, Atemminutenvolumen), die respiratorische Impedanz zur Beschreibung der Atmungsmechanik (dargestellt als respiratorische Resistenz [Maß für den Strömungswiderstand in den Atemwegen] und respiratorische Reaktivität [Maß für die Dehnbarkeit von Lunge und Thoraxwand]; beide Parameter im Frequenzbereich 3 bis 15 Hz) sowie der Strömungswiderstand in den proximalen sowie in den distalen Atemwegen.
Die experimentelle Infektion der Schweine mit *C. suis* zog signifikante Lungenfunktionsstörungen nach sich. Einer frühzeitig einsetzenden Obstruktion der distalen Atemwege (3 - 5 d.p.i.) folgte eine Obstruktion der proximalen Atemwege (etwa 7 d.p.i.). Das Atmungsmuster der infizierten Tiere war signifikant verändert (vermindertes Atemzugvolumen, erhöhte Atmungsfrequenz). Die klinisch unauffälligen Schweine mit einer natürlich erworbenen Präsenz von Chlamydien innerhalb des respiratorischen Systems waren frei von Symptomen einer respiratorischen Erkrankung und wiesen bis zum Alter von sechs Monaten keine Beeinträchtigung der Lungenfunktion auf.
Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Folgen einer respiratorischen Infektion mit Chlamydien von klinischer Inapparenz bis hin zu schwersten respiratorischen Dysfunktionen erheblich variieren können.

Der potenzielle diagnostische Nutzen der Analyse der Ausatemluft im Tierexperiment

Reinhold, P.*, Schröder, C. und Langenberg, A.

Die ausgeatmete „Luft“ (Exhalat) besteht nicht nur aus Wasserdampf sowie den Atemgasen O_2 und CO_2, sondern enthält eine Reihe von Metaboliten und Substanzen, die entweder direkt aus biochemischen Reaktionen innerhalb der Atemwege und des Lungengewebes resultieren oder auch aus dem Stoffwechsel des Organismus entstammen und über die Lunge eliminiert werden. Demzufolge kann die Analyse des Exhalates Aufschluss über respiratorische Entzündungsvorgänge bzw. Infektionen geben oder Rückschlüsse auf metabolische Reaktionen zulassen. International nimmt das Interesse an der diagnostischen Nutzung von Atemgasanalysen zu.
Eines der möglichen Verfahren, um Exhalat für Analysezwecke zu gewinnen, ist die Atemkondensatgewinnung. Dieses Verfahren basiert darauf, dass das ausgeatmete Gasgemisch durch ein Kühlsystem geleitet wird und dabei kondensiert. Entsprechend der Empfehlungen einer internationalen Expertengruppe (Task Force of the European Respiratory Society and of the American Thoracic Society) wird das auf diese Weise gewonnene „Atemkondensat“ als „exhaled breath condensate“ bezeichnet und offiziell als „EBC“ abgekürzt. Die Gewinnung

von EBC von Tier und Mensch ist problemlos unter Spontanatmung anwendbar; das Verfahren ist nicht-invasiv und beliebig oft wiederholbar. Somit kann die Gewinnung von EBC problemlos in die Planung von klinischen Studien oder Tierexperimenten implementiert werden.
Eigene Untersuchungen zur Gewinnung und Analyse von EBC wurden an Schweinen und Kälbern durchgeführt. Zur Atemkondensat-Gewinnung stand das für die Anwendung am Menschen kommerziell verfügbare Sammelsystem „ECoScreen“ (VIASYS Healthcare, Höchberg) zur Verfügung. Die biochemischen Analysen des Atemkondensates wurden in Kooperation mit der FILT Lungen- und Thoraxdiagnostik GmbH (Berlin-Buch) durchgeführt. Nachfolgend werden ausgewählte Ergebnisse zum Nachweis von Leukotrien B_4, Harnstoff und Ammonium und im EBC des Kalbes zusammengefasst.

Leukotrien B_4

Leukotrien B_4 (LTB_4) wurde hauptsächlich im EBC von Kälbern im Alter von bis zu zwei Monaten analysiert. Im Atemkondensat klinisch gesunder Tiere waren physiologische LTB_4-Konzentrationen im Bereich zwischen 32-225 pg/ml (Mittelwert ± SD: 116 ± 55 pg/ml) messbar. Die intra-individuelle Variabilität der LTB_4-Konzentration im EBC ist deutlich geringer als die inter-individuelle Variabilität. Hieraus ist zu schlussfolgern, dass die LTB_4-Konzentration im EBC eher für Verlaufsuntersuchungen innerhalb von Individuen als für den Vergleich verschiedener Tiergruppen geeignet erscheint. Die LTB_4-Konzentration im EBC ist mit der Anzahl neutrophiler Granulozyten in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit korreliert. Nach experimentellen respiratorischen Infektionen bakterieller oder viraler Genese stieg die LTB_4-Konzentration im EBC signifikant an. Im Falle einer bakteriell bedingten Bronchopneumonie war eine signifikante Korrelation zwischen der Abnahme der Lungendehnbarkeit und dem Anstieg der LTB_4-Konzentration im EBC zu beobachten. Bei einer viral bedingten Atemwegsinfektion schien die Erhöhung der LTB_4-Konzentration im EBC mit einer erhöhten unspezifischen Reaktivität der Atemwege in Beziehung zu stehen. Insgesamt wird eingeschätzt, dass die LTB_4-Konzentration im EBC als ein unspezifischer Marker für den Schweregrad einer Entzündung innerhalb der Atemwege diagnostisch nutzbar ist.

Harnstoff und Ammonium

Die Konzentrationen von Harnstoff und Ammonium wurden in Atemkondensaten von Schweinen und Kälbern gemessen. Unter physiologischen Bedingungen war sowohl ein Einfluss der Fütterung als auch des Atmungsmusters auf die Harnstoff- und/oder Ammonium-Konzentration im EBC feststellbar. Demzufolge sind diese biologischen Einflussfaktoren bei der Planung von Versuchsplänen zukünftig stärker zu berücksichtigen.
Im Falle einer experimentell ausgelösten Pneumonie des Kalbes (induziert durch gram-negative Bakterien) stieg die Harnstoff-Konzentration sowohl im Atemkondensat als auch im peripheren Blut signifikant an. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die erhöhten Harnstoffwerte im EBC in dem erwähnten Modell hauptsächlich Permeabilitätsveränderungen an der alveolo-kapillären Membran reflektierten. Im Gegensatz dazu stieg im selben Modell die Ammonium-Konzentration im EBC, nicht jedoch im peripheren Blut, signifikant an, was eine lokale Produktion von Ammonium in der pneumonisch veränderten Lunge vermuten lässt. Die endgültige Interpretation der Harnstoff- und Ammonium-Konzentrationen im Atemkondensat bedarf noch weiterführender Untersuchungen.

Mit dem Ausblick auf zukünftige Arbeiten ist zusammenfassend festzustellen, dass eine Vielzahl von Inhaltsstoffen im Atemkondensat nachweisbar ist. Es bedarf weiterführender Untersuchungen, um jene Inhaltsstoffe zu detektieren, die eine spezifische Infektion oder Entzündung widerspiegeln.

Die Analyse der Ausatemluft beim Tier hat nicht nur einen direkten Bezug zu veterinärmedizinischen Fragestellungen, die in Form von Tiermodellen zu bearbeiten sind, sondern eröffnet auch die Möglichkeit der Nutzung von Tiermodellen, um pathophysiologische Reaktionsmechanismen im respiratorischen System des Menschen gezielt zu untersuchen.

6 HISTOLOGISCHE, IMMUNHISTOLOGISCHE UND ULTRASTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN

Histologische Befunde bei Broilerküken aus Beständen mit Malabsorptionssymdrom (MAS) in Norddeutschland

Liebler-Tenorio, E.M.*, Otto, P., Elschner, M., und Löhren, U.

Das MAS der Küken ist ein weltweit beobachtetes Krankheitsgeschehen, dessen Ursache noch immer nicht eindeutig geklärt ist. Aus acht Beständen mit klinisch diagnostiziertem MAS in Norddeutschland wurden Gewebeproben (Darm und Parenchyme) von 34 zurückgebliebenen Küken und aus einem Bestand ohne klinische Anzeichen von MAS Gewebeproben von sieben normal entwickelten Küken untersucht. Gleichzeitig erfolgte aus dem Darminhalt der Tiere der Nachweis von enteralen Viren. In den Beständen, in denen weder Rotavirus A noch Rotavirus D nachweisbar war, trat nur bei einzelnen Tieren im Dünndarm eine geringgradige Zottenverkürzung (Zottenatrophie) auf. In den Beständen, in denen vorwiegend Rotavirus A nachweisbar war, war ebenfalls nur bei einzelnen Tieren im Dünndarm eine geringgradige Zottenatrophie zu finden. Es wurde jedoch vermehrt Krypthyperplasie im Dünndarm beobachtet. Bei der Mehrzahl der Küken aus Beständen, in denen nur Rotavirus D oder sowohl Rotavirus A als auch Rotavirus D nachweisbar war, war eine ausgeprägte Zottenatrophie, Krypthyperplasie und Apoptose von Kryptepithelzellen zu finden. Leber, Niere, Milz, Herz, Bursa Fabricii und Pankreas waren ohne besonderen Befund. Bei einem Teil der Tiere wurden Sehnenscheiden und Sehnen untersucht; hierbei ergaben sich keine Hinweise auf entzündliche Veränderungen. Diese Befunde machen deutlich, dass die Hauptbefunde im Dünndarm zu finden sind. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Rotavirus D (nicht jedoch Rotavirus A) und dem Auftreten von Darmveränderungen. In weiterführenden Untersuchungen ist geplant, diese Befunde durch experimentelle Infektion von Broilerküken mit Rotavirus A und D zu erhärten.

Rasterelektronenmikroskopische Befunde an der Darmschleimhaut von Kälbern in einem kompakten Ussingkammer-System

Bretschneider, M.*, Diller, R. und Liebler-Tenorio, E.

Ziel der Untersuchung war die Abklärung, ob ein kompaktes Ussingkammer-System (Fa. Mussler, Aachen) geeignet ist, die Invasion von Erregern durch die Darmschleimhaut und die Wirts-Erreger-Interaktion an der Epitheloberfläche *ex vivo* zu untersuchen. Hierfür wurde Darmschleimhaut von Kälbern in das kompakte Ussingkammer-System verbracht. Zu definierten Zeitpunkten nach dem Einspannen wurde die Integrität der Schleimhaut im Rasterelektronenmikroskop (REM) kontrolliert und die Befunde mit den Messdaten für Membranintegrität (transmukosale Potenzialdifferenz und Widerstand) verglichen.
Die Darmschleimhaut wurde aus dem Ileum von drei etwa ein Jahr alten Holstein-Friesen Färsen in tiefer Narkose entnommen, in Zellkulturmedium mit Antibiotikumzusatz verbracht, zurechtgeschnitten und die Muskulatur mechanisch entfernt. Bis auf ein Stück Kontrollgewebe wurden die Schleimhautproben (Durchmesser etwa 1 cm) in die Ussingkammer eingespannt und transmukosale elektrische Potenzialdifferenz und Widerstand gemessen. Das Kontrollgewebe und die 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Stunden nach Messbeginn aus der Ussingkammer entnommenen Proben wurden in Glutaraldehyd fixiert und für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung präpariert.
Die Widerstandswerte zeigten bei allen drei Tieren eine markante Abnahme während der ersten Stunde und blieben über die weitere Messdauer stabil. In der Kontrollprobe, die nicht in die

Ussingkammer eingespannt worden war, waren blattförmige Zotten und Falten zu finden, die von intaktem Epithel überzogen waren. Vereinzelte abgebrochene Zottenspitzen wurden als Präparationsartefakt interpretiert. Bei allen drei Tieren war bereits in den Proben, die nach einer Stunde aus der Ussingkammer entnommen wurden, eine Zerstörung der Zotten vor allem in der Peripherie in Nähe der zirkulären Klemmstelle zu finden. Im weiteren Zeitverlauf trat auch in den weiter zentralen Bereichen der Proben eine Zerstörung der Schleimhautarchitektur und Epithelverlust auf. Vor allem die Proben, die nach sechs Stunden entnommen wurden, waren von einer dicken Schicht Zelldetritus überlagert.
Das REM erlaubt die gesamte Oberfläche der Probe zu untersuchen, die räumliche Zuordnung der Veränderungen darzustellen und nicht nur die Zottenformen, sondern auch das Epithel und die Geschlossenheit des Epithelverbandes darzustellen. Die Befunde machen deutlich, dass die getestete Ussingkammer nicht geeignet ist, die Interaktion von Mikroorganismen mit einer intakten Darmbarriere *ex vivo* zu untersuchen.

7 DIAGNOSTIKENTWICKLUNG UND NEUE NACHWEISVERFAHREN

Entwicklung und Herstellung von monoklonalen Antikörpern für Forschung und Tierseuchendiagnostik

Dauber. M.*, Bergmann, S. M. und Fichtner, D.

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 hämatopoetischen Nekrose (IHNV), dem Virus der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV), dem Koi-Herpesvirus (KHV) und dem White Bream Virus (WBV, „Güster-Virus“). Gegenwärtig laufen Arbeiten zur Entwicklung von mAks zur Erkennung des Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV) und den Erregern der Epizootischen haematopoetischen Nekrose (European sheatfish and catfish virus, ESV/ECV).

Virus der Epizootischen hämatopoetischen Nekrose (European sheatfish virus [ESV] und European catfish virus [ECV])

Es wurde mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper (mAk) zum Nachweis dieser Iridoviren begonnen, die vor allem bei Regenbogenforellen und Welsen in Europa die beim OIE anzeigepflichtige Epizootische hämatopoetische Nekrose verursachen. Bisher liegen zwei mAks vor, die aus der Immunisierung von Mäusen mit ECV-Antigen resultieren. Diese Antikörper reagieren in der indirekten Immunfluoreszenz erwartungsgemäß sowohl mit dem homologen ECV als auch mit ESV. Zwar wären mAks wünschenswert, die eine Diskriminierung von ECV und ESV erlaubten, es erscheint aber eher unwahrscheinlich, dass dies auf Antigenbasis möglich ist. Die Arbeiten werden mit dem Ziel der Erlangung weiterer mAks und deren Charakterisierung fortgeführt.

Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV)

Das SVCV teilt antigene Determinanten mit dem Pike-fry-Rhabdovirus (PFRV). Insofern ist es nicht überraschend, dass nach Immunisierung von Mäusen mit SVCV monoklonale Antikörper (mAk) erhalten werden, die in der indirekten Immunfluoreszenz mit beiden Viren reagieren. Von zwei mAks liegen bisher Daten vor, einer von ihnen weist das genannte Reaktionsverhalten auf. Er erkennt sämtliche acht getesteten SVCV-Feldisolate und PFRV, jedoch keine anderen Fisch-Rhabdoviren (VHSV, IHNV, Rhabdovirus vom Aal). Der zweite mAk reagiert zwar nicht mit dem PFRV, erkennt aber auch zwei SVCV-Isolate nicht. Ziel weiterer Arbeiten ist die Entwicklung von mAks, die möglichst alle SVCV-Isolate erkennen und keine Kreuzreaktionen mit anderen Viren aufweisen.

Etablierung eines Random-Amplification-PCR-Protokolls zur schnellen Zuordnung neuer Virusisolate

Keil, G.*

Zur schnellen Zuordnung neuer Virusisolate, die mit den verfügbaren diagnostischen Möglichkeiten nicht identifizierbar sind, wurde ein Verfahren etabliert, das auf der unspezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR basiert. Diese so genannte "Random-Amplification-PCR" produziert mittels beliebiger Primer von DNA (RAP) oder cDNA (RT-RAP) Fragmente, die nach Klonierung sequenziert werden können. Die Unspezifität der PCR wurde durch Variation der Reaktionsbedingungen so optimiert, dass für

alle getesteten DNA und RNA Viren Amplifikate von mindestens 500 bp Länge erreicht wurden. Das reicht aus, um bei Datenbankabgleichen verwandte Sequenzen zu identifizieren bzw. bei fehlender Homologie spezifische Sonden abzuleiten.

Herstellung boviner Zellkulturen, die nicht auf Interferone reagieren
Keil, G.*

Interferone sind sezernierte Proteine, die in virus-infizierten Zellen produziert werden und in umgebenden Zellen einen antiviralen Zustand induzieren, was die Isolierung und Vermehrung von Interferon-sensitiven Viren erschweren kann. Auch die Anzucht attenuierter Viren oder (rekombinanter) Impfviruskandidaten, denen die Gene für Interferonresistenz deletiert wurden, kann auf Interferon-produzierenden Zellen behindert sein. Viele Viren produzieren jedoch Proteine, die den Interferon Signalweg blockieren können. Dazu gehört das V Protein des Simian Virus 5 (SV5-V), das die Degradation von STAT1 bewirkt. STAT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl für die Wirkung von alpha/beta-Interferon als auch gamma-Interferon notwendig ist. In ersten Ansätzen wurden zwei transgene bovine Zelllinien, MDBK-V and KOP/R-V isoliert, die das SV5-V konstitutiv exprimieren. Sie sind, wie erwartet, insensitiv gegen alpha-Interferon und ermöglichen die Vermehrung Interferon-empfindlicher Viren wie Vesicular Stomatitis Virus oder Newcastle Disease Virus in Anwesenheit hoher Interferondosen.

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 ausgewählten Beispielen gezeigt werden.

Entwicklung diagnostischer Nachweisverfahren für neue Infektionserreger
Hoffmann, B.* und Groschup, M.H.

Neben TSE-Erkrankungen sollen am INNT auch andere neuartige Infektionskrankheiten („Emerging Diseases“) untersucht werden. Beispiele dafür sind das Nipah-Virus und das Hendra-Virus. Beide gehören zur Familie der Paramyxoviren und bilden zusammen das neue Genus *Henipavirus*. Die Sequenzhomologie zwischen diesen beiden Pathogenen liegt bei 78 %.
Das Nipah-Virus, das bei Schweinen das „porzine respiratorische und Enzephalitis Syndrom“ (PRES) auslöst, wurde erstmalig im September 1998 in Malaysia diagnostiziert. Das Virus

zeigte ein starkes zoonotisches Potenzial 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.
Da für die Arbeiten mit diesen hochvirulenten Viren Sicherheitsstufe 4-human notwendig ist, müssen die Untersuchungen vorerst auf biochemische und molekularbiologische Fragestellungen und auf die Etablierung diagnostischer Nachweisverfahren beschränkt bleiben.
Erste Aufgabe ist die Entwicklung von real-time RT-PCR-Systemen zum Nachweis von Nipah- und Hendra-Virusgenom. Hierzu werden sowohl publizierte Tests als auch eigene Entwicklungen etabliert. Weiterhin sind Untersuchungen zu Struktur und Funktion der Membran- und Nukleokapsidproteine geplant.

8 ZELLBANK UND VIRUSSTAMMHALTUNG

8.1 Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin

Riebe ,R.* und Lenk, M.

Aufnahme neuer Zelllinien in die Zellbank (ZB):

Im Berichtszeitraum wurden 62 Zelllinien in die ZB aufgenommen. Dabei handelt es sich um:

- 15 etablierte und begrenzt wachsende Linien aus anderen wissenschaftlichen Einrichtungen des In- und Auslandes (Fisch, Mensch. Rind, Schwein)
- 12 Neuanzüchtungen der ZB, deren Linienentwicklung nicht abgeschlossen ist (Pferd, Maus, Rind, Huhn)
- 26 gentechnisch veränderte Linien verschiedener Arbeitsgruppen des FLI und anderer wissenschaftlicher Einrichtungen
- 9 Hybridome verschiedener Arbeitsgruppen des FLI und anderer wissenschaftlicher Einrichtungen

Aktueller Linienbestand der Zellbank 2004:

- 999 Zelllinien von 40 Tierspezies und Mensch (29 nicht mehr relevante transgene Linien wurden aus dem Bestand entfernt)

Abgaben aus der Zellbank 2004:

Im Berichtszeitraum wurden 1.663 Zellabgaben von etwa 200 verschiedenen Zellsystemen getätigt. Dazu gehören:

- 208 Abgaben von 81 verschiedenen Zelllinien an Institute in Deutschland, USA, Bulgarien, Tschechien, Belgien, Schweiz, Österreich, Israel, Niederlande, Polen, Litauen, Estland, Türkei, England, Spanien, Frankreich, Ungarn, Italien
- 1.455 Abgaben von 197 verschiedenen Zellsystemen an die Institute des FLI
- neben etablierten Zelllinien wurden kontinuierlich primäre, embryonale Hühnerfibroblasten sowie Leber- und Nierenzellen vom Huhn und andere primäre Kultursysteme aus Kryovorräten zur Verfügung gestellt (insgesamt 43,4 Liter Zellsuspension)
- es wurden mehr als 35 verschiedene Zellzuchtmedien und –lösungen gebrauchsfertig bereit gestellt, dazu notwendige umfangreiche Serumprüfungen inbegriffen (insgesamt 3.063 Liter sterile Medien und ein Serumverbrauch von 180 Litern FKS und 20 Litern Rinderserum eigener Herstellung)

Arbeiten zur Zellcharakterisierung und Standardisierung:

- Bestimmung der allgemeinen Wachstumscharakteristika der Neuaufnahmen
- regelmäßige Charakterisierung der Linien durch Karyotypisierung (Ermittlung der Stemline, Erstellung von Karyogrammen), 15 Linien im Berichtszeitraum
- wöchentliche Mykoplasmenkontrolle aller sich in Kultur befindlichen Zelllinien mit Kulturmethode, DNA-Färbung und PCR (2.386 Einzeluntersuchungen an 203 Zelllinien in Zusammenarbeit mit dem bakteriologischen Labor, DVM Polster)
- regelmäßige Fremdviruskontrolle mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik, Polymerasekettenreaktion und Elektronenmikroskopie zum bevorzugten Nachweis des BVD-Virus (Einzelkontrolle jeder FKS-Flasche, ständige Kultivation verschiedener Suchlinien)
- wöchentliche Blutung der zellbankeigenen Rinder und Herstellung hochwertiger, sicher BVDV-freier Zellzuchtseren
- regelmäßige Authentizitätskontrollen von Kulturen per PCR cell typing (Analyse des Intron G des Aldolasegens)

- Charakterisierung und Identitätskontrollen von Kulturen mittels Isoenzymanalyse
- Kryokonservierung von 1.891 Ampullen von 158 verschiedenen Zelllinien.

Weitere Arbeiten:

- Arbeiten zur weiteren Linienentwicklung bereits vorgestellter Neuanzüchtungen konnten erfolgreich fortgeführt werden, wobei durch Alteration zur Permanenz einige neue permanente Zelllinien entstanden sind, z. B. Kaninchen (Knochenmark; periphere Blutzellen; Leber), Wisent (Thymus), Damwild (embryonale Magenanlage). Zellen vom Elefanten ließen sich nur bis etwa zur 30.-40. Subkultur passagieren und liegen als so genannte ‚finit lines' vor.
- Für das Tollwut-Referenzzentrum und zur Weitergabe an Dritte (WHO u.a.) wurden größere Mengen mAk in Form von Zellkulturüberständen von verschiedenen Hybridomen bereitgestellt.
- Aus den Gehirnen zweier neugeborener Mäuse einer transgenen Mauslinie, die das ovine PrP^c überexprimiert, wurde eine neue Zelllinie angezüchtet. Die bisherige Linienentwicklung lässt eine neue permanente Linie erwarten. Die Zellen wurden der BSE-Forschung zur Verfügung gestellt.
- Versuche zur Sanierung einer bovinen Trachea-Zelllinie von einer massiven BVDV Kontamination unter Verwendung eines hochtitrigen polyklonalen Antiserums, Interferon und 15µg/ml Mycophenolsäure im Kulturmedium waren nicht erfolgreich. Nach mehreren Subkulturen unter diesen Bedingungen sank die Zahl der positiv fluoreszierenden Zellen nur geringfügig. Im Gegensatz dazu konnte BVDV kontaminiertes bovines Foamy-Virus schon nach einer Subkultur auf nicht BVDV permissiven BHK21-Zellen von der Kontamination befreit werden.
- Für die bereits vorgestellte Thymozytenzelllinie der Maus (CCLV281;MTH-R) mit hervorragenden Feederlayereigenschaften für diverse schlecht wachsende Hybridome konnte die Expression verschiedener Zytokine (IL-1ß;IL-2;IL-10;IL-6) nachgewiesen werden mit abfallender Tendenz bei steigender Zahl der Subkultivierungen.

Etablierung von Zelllinien mariner Evertebraten:

Im Berichtszeitraum wurden in erster Linie Versuche zur Eliminierung von Kontaminationen in angelegten Primärkulturen ausgeführt. Massiver Einsatz von Antibiotika und Fungiziden wirkt sich negativ auf die Primärkulturen von Molluskenzellen aus. Andererseits führt eine längere Kultivierung (> 6 Wochen) trotz der Fungizidbehandlung zum regelmäßigen Auftreten von Thraustochytriaceen. Bisher wurden keine Substanzen gefunden, die das Auftreten dieser Protisten gezielt unterdrücken.

Primärkulturen wurden angelegt von *Mytilus edulis* (Miesmuscheln) und *Buccinum undatum* (Wellhornschnecke). Die Miesmuscheln wurden aus der Ostsee entnommen. Sie lebten bei einem Salzgehalt von ca. 10 ‰. Dieser Salzgehalt entspricht einer Osmolalität von ca. 300 mOsmol. Die meisten für Säugerzellen verwendeten Medien liegen in diesem Bereich. Keines der getesteten Medien fördert eine Anheftung der Zellen und eine Proliferation. Für die Primärkultur von *B. undatum*-Zellen wurden verschiedene in der wissenschaftlichen Literatur aufgeführte Medienformulierungen getestet. Adhäsion an Substrat und Teilung der Zellen wurden nicht beobachtet.

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.
Die meisten Kontaminationen sind auf mit Mykoplasmen verunreinigte Zellkulturen zurückzuführen.
Insgesamt wurden im Berichtszeitraum 2.983 Zellkulturen und Virusproben auf das Vorkommen von Mykoplasmen untersucht. 23 dieser Proben waren positiv (0,77 %). Es wurden 6-mal Mycoplasma (M.) arginini, 3-mal M. hyorhinis, 1-mal M. columborale und 13-mal Acholeplasma laidlawii gefunden. Gyrasehemmer eignen sich 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 die Institute des FLI sowie für andere Einrichtungen des In- und Auslandes bereitgestellt und zertifiziert abgegeben. Zum Sammlungsumfang zählen neben international anerkannten Referenzstämmen solche Virusstämme und -isolate der wichtigsten Haustiere, die als ”nationale” Referenzstämme dienen bzw. Krankheitsgeschehen zeitlich und räumlich dokumentieren. Nicht erfasst werden in der Regel 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 Fremdviren) bekannt bzw. geprüft ist. Bei Notwendigkeit veranlasst diese Prüfung die Virusbank 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 fernerhin in der Lage, Virusstämme mit Weitergabebeschränkung zu deponieren.
Im Bestand der Virusbank befinden sich gegenwärtig mehr als 500 Virusstämme und -isolate von nahezu 70 Spezies von Rind, Schwein, Pferd, Hund, Katze und Geflügel, aber auch von Ziege, Schaf, Giraffe, Afrikanischem Elefant und verschiedenen Fischarten. 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. Die Abgabe weiterer Virusstämme ist nach Absprache und z. T. mit Einschränkungen möglich und bedarf in der Regel zuvor weiterer Bearbeitung. Im Berichtsjahr wurden 44 verschiedene Virusstämme abgegeben, diese gingen 24-mal an Untersuchungsämter in den Bundesländern, 31-mal an Forschungsinstitute bzw. Universitäten, viermal an Institute des FLI, zweimal an private Unternehmen und sechsmal in das Ausland.

9 INFORMATIK, BIOSTATISTIK, DOKUMENTATION

Anwendung geographischer Informationssysteme und raumbezogener statistischer Methoden in der Veterinärepidemiologie

Klöß, D., Müller, T., Schröder, R., Selhorst, T., Staubach, C.*, Tackmann, K., Teuffert, J. und Ziller, M.
(Zusammenarbeit mit Thulke, H.-H., Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle; Schach, U., Universität, Dortmund; Held, L., Schmid, V., Universität München; Stoyan, D., Technische Universität Freiberg; Hugh-Jones, M., Louisiana State University, USA; Franke, C.R., Universität von Bahia, Tierärztliche Hochschule, Salvador, Brasilien)

Geographische Informationssysteme (GIS) und räumliche Epidemiologie spielen eine immer größere Rolle bei der Tierseuchenbekämpfung. Seit geraumer Zeit werden in den Veterinär- und Untersuchungsämtern der Bundesrepublik Deutschland und anderer EU-Mitgliedsstaaten (z. B. Niederlande, Vereinigtes Königreich, Dänemark) GIS in der praktischen Tierseuchenbekämpfung angewendet. Einsatz finden GIS vor allem bei Ausbrüchen anzeigepflichtiger Tierseuchen. Sie unterstützen den Amtstierarzt bei der Definition von Sperrgebieten, Bestandszählungen wie auch 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) werden in einer laufenden Studie 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 Ausbrüche in unterschiedlich tierdichten Gebieten ungefähr abzuschätzen. In Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Freiberg wurden neue GIS Analyseroutinen und statistische Methoden entwickelt, um den Zusammenhang zwischen Umwelt und dem Auftreten von Krankheiten besser zu beschreiben. Am Beispiel von Daten zu *Echinococcus multilocularis* beim Fuchs wurden die Ergebnisse mit denen eines raumbezogenen logistischen Regressionsmodells verglichen. Aggregierte Daten basierend auf administrativen Einheiten und regelmäßigen Zeiträumen der Berichterstattung sind häufig der einzig mögliche Weg, um Wildtierkrankheiten in Zeit und Raum zu beobachten. In Zusammenarbeit mit der Universität München wurde versucht, die gebietsspezifische Prävalenz der Erkrankung, den zeitlichen Trend sowie den Einfluss von Umweltfaktoren mit Hilfe von Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Simulationstechniken innerhalb eines Bayesianischen statistischen Modells zu schätzen. Mittlerweile konnten umfangreiche Tools zur Datenaufbereitung und statistischen Analyse etabliert und validiert werden. Daten zur Schweinepest bei Wildschweinen und *Echinococcus multilocularis* dienten als Beispiele für Überwachungsdaten in Raum und Zeit.

Computergestützte Simulation von Wildtierkrankheiten (Klassische Schweinepest des Schwarzwildes)

Kaden, V., Klöß, D., Selhorst, T. und Staubach, C.*
(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 von zeitlich und räumlich geschichteten 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.

Internationale Tierseuchensurveillance und Untersuchungen zum Einschleppungsrisiko von Tierseuchen durch die Einfuhr von lebenden Tieren und bestimmten Waren tierischer Herkunft

Kramer, M.*, Micklich, A. und Kroschewski, K.

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 erhöht 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. ANIMO, TRACES, Eurostat, ADNS, Handistatus 2 etc.), aber auch Angaben aus Ländern dient dem Ziel, Gefährdungspotenziale 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 Liste A, auftraten, vom Handel ausgeschlossen wurden, greifen heute mehr Regionalisierungskonzepte nach WTO-Kriterien. Das führt 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 Erregereintrags bei lebenden Tieren und bei Waren unter Verarbeitungsbedingungen berücksichtigt. Letztendlich können diese Risikoanalysen dazu beitragen, Einfuhrentscheidungen zu unterstützen.

Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der Schweinepest bei Haus- und Wildschweinen in den Jahren 1993 - 2004

Teuffert, J.*, Staubach, C. und Fritzemeier, J.

Im Ergebnis einer Analyse der Jahre 1993 bis einschließlich 2004, die gemeinsam mit dem Institut für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover erarbeitet wurde, konnten gesicherte bzw. begründet vermutete Ursachen der Einschleppung des KSP-Virus in die Seuchenbetriebe ermittelt werden. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund einer unbestimmbaren Fehlerrate lediglich die Größenordnungen der Angaben zur Einschleppungsursache aussagekräftig sind.

Bei den Primärausbrüchen (31 % der KSP-Ausbrüche insges.) standen die Einschleppung über direkte und indirekte Kontakte zu infizierten Wildschweinen (61 %) und die Verfütterung von kontaminierten Speise- und Küchenabfällen (22 %) im Vordergrund. Für den Rest (17 %) ergaben sich weder aus der Betriebskontrolle, seiner Ver- und Entsorgung noch der Umgebung Hinweise für eine Einschleppungsursache der Schweinepest. Bei Folgeausbrüchen lag die Ursache im Tierverkehr (29 %), in der Nachbarschaft zu betroffenen Betrieben (25 %) sowie im Personen- (14 %) bzw. Fahrzeugkontakt (9%). In 23 % der Fälle konnte die Einschleppungsursache nicht ermittelt werden.

Die Ermittlung der Einschleppungsursache erfolgte, so sie nicht sofort erkennbar war, nach einem Ausschlussprinzip anhand der mittels Fragebogen erhobenen Informationen. Hilfestellung erfuhren wir durch im Zusammenhang mit dem Krankheits- bzw. Seuchengeschehen durchgeführten klinischen und labordiagnostischen Untersuchungen. So wurde seit Jahren bei jedem Primärausbruch eine genetische Virustypisierung durchgeführt, die eine Abgrenzung unterschiedlicher Seuchengeschehen zuließ.

Genetische Virustypisierungen erfolgten darüber hinaus auch stichprobenartig bei KSP-Seuchenfeststellungen in der Wildschweinepopulation. Für alle in der Vergangenheit bzw. gegenwärtig noch mit Wildschweinepest infizierten Gebiete sind die dort vorherrschenden Schweinepestsubtypen bekannt.

Der Vergleich der über die genetische Virustypisierung erzielten Ergebnisse im Hauschweinepestfall mit dem in der Wildpopulation vorherrschenden Virussubtyp gab uns Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang beider Geschehen. Darüber hinaus kann das lokale Auftreten des Hausschweinepestfalles einen wichtigen Hinweis für die Einschleppungsursache geben.

Die Hausschweinepestfälle der letzten Jahre traten in Gebieten auf, die von Wildschweinepest betroffen waren, so z. B. in Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Niedersachsen und Rheinland-Pfalz. Dabei war der analysierte Virussubtyp in den Hausschweinebeständen identisch mit dem in der Umgebung der Hausschweinebestände bekannten und nachgewiesenen Virussubtyp bei den Wildschweinen. Es ist davon auszugehen, dass in Gebieten, in denen KSP-Virus in der Wildschweinpopulation zirkuliert, ein deutlich höheres KSP-Einschleppungsrisiko für Hausschweine besteht als in Gebieten ohne eine KSP-Problematik bei Wildschweinen. Das wird insbesondere immer dann relevant, wenn Mängel in

der seuchenhygienischen Absicherung der Schweinehaltungsbetriebe bzw. ihrer Bewirtschaftung vorliegen.
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Kette von Indizien vorliegen muss, um analytisch zur Einschleppungsursache direkter bzw. indirekter Wildschweinkontakt zu gelangen. Wenn beispielsweise bei Primärausbrüchen im Hausschweinebereich kein potenziell mit KSP-Virus kontaminiertes Futter verabreicht wurde und weder Hinweise für einen KSP-Viruseintrag aus dem Ausland noch zu kriminellen Handlungen vorliegen, statt dessen aber der Ausbruch in einem Gebiet liegt, in dem die Wildschweinepest vorkommt, sein genetisch analysierter Virussubtyp mit dem im umgebenden Wildschweinbestand übereinstimmt und direkte bzw. indirekte Kontakte zu Wildschweinen bzw. deren Ausscheidungen nicht auszuschließen sind, gehen wir davon aus, dass es sich bei der Einschleppung um direkten bzw. indirekten Wildschweinkontakt handelt. Dieser kann sowohl von KSP-infizierten lebenden und toten Wildschweinen sowie ihren Exkreten und Sekreten ausgehen und auf unterschiedliche Art und Weise (Personen, Futtermittel, Stroh, Silagen etc.) in den Betrieb hineingetragen werden.
Schweinepest bei Hausschweinen trat in den Jahren 2001 bis gegenwärtig nur in solchen Regionen auf, in denen die Wildschweine von dieser Tierseuche betroffen waren. In keinem der acht von Wildschweinepest betroffenen Bundesländern trat nach dem letzten Schweinepestfall bei Wildschweinen ein solcher bei Hausschweinen auf.

Aufhebung der infolge des Auftretens der Wildschweinepest gebildeten Restriktionsgebiete in den Bundesländern Saarland, Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen

Teuffert, J.*, Staubach, C. und Kaden, V.

Im Rahmen der nach Artikel 23 der Richtlinie 2001/89/EG gebildeten Sachverständigengruppe wurden die Bekämpfungsmaßnahmen der Wildschweinepest der Bundesländer Saarland, Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen analysiert. Die Zielsetzung bestand vor allem darin, zu prüfen, inwieweit die Voraussetzungen zur Beantragung der Einstellung der oralen Immunisierung der Wildschweine sowie der Aufhebung der damit einhergehenden Handelsbeschränkungen bei der Kommission der EU gegeben sind. Weiterhin wurden inhaltliche Schwerpunkte der Erarbeitung der Abschlussberichte zur Wildschweinepestbekämpfung betroffener Bundesländer als Grundlage der Antragstellung bei der EU-Kommission diskutiert.
Nachdem die Beschränkungen nach der Entscheidung 2003/526/EG für das Saarland vom Ständigen Ausschuss für die Lebensmittelkette, die Tiergesundheit und den Tierschutz im März 2003 aufgehoben wurden, geschah dies im September für Nordrhein-Westfalen und im Dezember 2004 für Niedersachsen. Darüber hinaus billigte der Ausschuss am 7.12.2004 die Beendigung der Köderauslagen für Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen, im Januar 2005 für das Eifelgebiet in Rheinland-Pfalz.
Somit sind gegenwärtig nur noch Gebiete des Bundeslandes Rheinland-Pfalz von Restriktionsmaßnahmen infolge Schweinepest bei Wildschweinen betroffen. Einen groben Überblick zum Schweinepestgeschehen bei Wildschweinen in Deutschland vermittelt die anliegende Tabelle.

KSP-Seuchenfeststellungen, Impfmaßnahmen und Ergebnisse der genetischen Virustypisierung bei Wildschweinen betroffener Bundesländer

Bundesland	Daten Erstaus-bruch	Letzter Virus-nachweis	Anz. Fälle insges. (bis 31.03.03)	Anz. betrof-fener Kreise	Impfköderauslage		Max. Größe Impfgeb. (km^2)	Genet. Virustypi-sierung
					von	bis		
Niedersachsen	12/1992	13.06.02	70 538	1 8	1993[1)] 1997	1994 Frühj. 2004	1.300 2.525	2.3 Uelzen 2.3 Uelzen
Mecklenburg-Vorpommern	01.03.93	21.07.00	1.094[2)]	12	12/94	06/02	10.617	2.3 Güstrow 2.3 Rostock 2.3 Spante
Brandenburg	14.03.95	26.04.00	287	5	04/95	04/01	6.173	2.3 Güstrow
Baden-Württemberg	30.09.98	19.11.99	69	4	08/99	10/01	1.300	2.3 Uelzen
Sachsen-Anhalt	12.10.99	19.09.00	46	2	12/99	11/01	3.854	2.3 Uelzen
Rheinland-Pfalz	a) 05.01.99	24.03.03	786	8	02/02	Herbst 2004	8.600	2.3 Rostock
	$b_{1)}$ 1993	02/1995	117	9	ohne Impfködereinsatz			2.3 Uelzen
	b_2) 23.10.98	12.11.04	190	10	01/03	gegenwärtig	4.300	2.3 Uelzen
Saarland	26.01.01	13.06.02	16	2	03/02	Herbst 2003	731	2.3 Rostock
Nordrhein-Westfalen	22.04.02	14.10.02	57	3	08/02	Frühjahr 2004	1.531	2.3 Rostock

1) Impfködereinsatz nur im Teilgebiet des LK Soltau-Fallingbostel
2) 93/94 sind serolog. Nachweise mit enthalten
a) Eifelgebiet
b1) b2) Rheinhessen/Pfalz

Änderung der Stichprobenuntersuchung bezüglich der Kontrolle zur Aufrechterhaltung der Freiheit von der Aujeszkyschen Krankheit

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

Intensive Überwachungs- und Bekämpfungsmaßnahmen führten dazu, dass am 17.03.2000 der letzte AK-Ausbruch in einem deutschen Hausschweinebestand festgestellt werden konnte. Mit der Entscheidung 2003/130/EEC der Kommission ist die Bundesrepublik Deutschland offiziell als frei von Aujeszkyscher Krankheit anerkannt.
Die Bedingungen für die Aufrechterhaltung des Status eines von AK freien Schweinebestandes sind in der Neufassung der Verordnung zum Schutz gegen die Aujeszkysche Krankheit, Abschnitt II, vom 10. November 1997 aufgeführt. Danach dürfen in Seuchenbeständen keine klinischen Auffälligkeiten vorhanden sein, die auf AK hindeuten. Weiterhin ist für alle Schweinezucht- und -aufzuchtbestände, Besamungsstationen, Schweinemast- und Gemischtbestände die serologische Stichprobenuntersuchung im Abstand von sechs Monaten vorgesehen, wobei der zuständigen Behörde, abhängig von der epidemiologischen Situation, hinsichtlich des Untersuchungsintervalls ein Ermessensspielraum von drei bis zwölf Monaten eingeräumt wird. Der innerhalb der Bestände nach Abschnitt II vorgegebene Stichprobenschlüssel unterscheidet zwischen

a) Beständen mit Zuchtsauen und Aufzuchtbeständen sowie Besamungsstationen
b) Schweinemastbeständen.

Die Zielstellung für die in a) aufgeführten Bestände besteht darin, eine 10 %ige AK-Prävalenz mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit zu erkennen, während es für die in b) aufgeführten Bestände eine 20 %ige AK-Prävalenz mit gleicher Wahrscheinlichkeit zu erkennen gilt. Inzwischen haben sich mit der Anerkennung der AK-Freiheit für Deutschland die epidemiologischen Verhältnisse in Bezug auf die Aujeszkysche Krankheit grundlegend geändert, so dass über eine Anpassung bzw. Reduzierung der Überwachungsuntersuchungen nachgedacht wird. Eine Möglichkeit zur Reduzierung des in der AK-Verordnung vom 10. November 1997 in deren Anlage, Abschnitt II, aufgeführten Kontrollprogramms zur Aufrechterhaltung der AK-Freiheit sehen wir in der Anwendung eines zweistufigen Stichprobenplanes; das heißt anstelle der Untersuchung aller Schweinehaltungsbetriebe eine Stichprobe von Schweinezucht- und -mastbeständen und darin Schweine nach dem Stichprobenschlüssel entsprechend AK-Verordnung, Abschnitt II, zu untersuchen. Wendet man dieses Verfahren an, müssen auf Bundesebene bei einer angenommenen Prävalenzschwelle von 0,2 % der Bestände und einer Sicherheit von 95 % anstatt der ursprünglich 115.537 nur noch 3.097 Bestände, d.h. 2,8 % untersucht werden. Vorschläge für mögliche Verfahrensabläufe beim Auftreten eines oder mehrerer positiver Bestände werden aufgezeigt.

Epidemiologische Analysen zum Stand der Bekämpfung der Bovinen Herpesvirus Typ 1–Infektion (BHV1) in Deutschland

J. Teuffert*

Mittels Berichtsbogen übermittelte Angaben aus den Bundesländern bildeten die Grundlage für die Auswertung des Standes der BHV1-Bekämpfung auf Bundes- und Landesebene. Diese verfolgte insbesondere folgende Zielstellungen:

1. die Ausweisung des aktuellen Anteils bei Milch- und Mutterkühen einschließlich ihrer Nachzucht auf Bestandsebene und bei den Rindern in den Kategorien „BHV1-frei“, „Sanierungsbestände“ und „Sonstige Bestände“;
2. den Versuch der Darstellung des Sanierungsfortschritts.

Per 31.12.2003 zeigt die bundesweite Auswertung, dass unter Einbeziehung von 168.357 Beständen aus dem Milch- und Mutterkuhbereich folgender Stand in der BHV1-Sanierung erreicht ist:

- 69,4 % der Bestände sind BHV1-frei
- 20,5 % der Bestände befinden sich im Sanierungsverfahren
- 10,1 % der Bestände sind der Kategorie „Sonstige Bestände“ zuzuordnen.

Für den gleichen Zeitpunkt ergibt sich unter Einbeziehung von 11.341.598 Rindern, dass

- 56,4 % der Rinder „BHV1-freien“ Beständen
- 37,7 % der Rinder „Sanierungsbeständen“ und
- 5,9 % der Rinder „Sonstigen Beständen“ zuzuordnen sind.

Betrachtet man den Auswertungszeitraum 1. Halbjahr 2001 bis zum 31.12.2003, so hat sich bundesweit der BHV1-freie Anteil bestandsbezogen um 17,8 % und tierbezogen um 7,6 % erhöht. Das heißt, der Zuwachs kommt hauptsächlich aus kleinen und mittleren Betrieben.

In der BHV1-Kategorie „Sonstige Bestände“ nahmen der bestandsbezogene Anteil um 24 % und der tierbezogene Anteil um 15,7 % ab. Das ist einerseits ein deutliches Anzeichen dafür, dass sich immer mehr Betriebe dem BHV1-Bekämpfungsprogramm anschließen, es andererseits aber noch 10,1 % der Betriebe gibt, die keine zielgerichtete BHV1-Bekämpfung betreiben.
In Beständen der spezialisierten Jungrinderaufzucht und Mastrinderhaltung, die neben der Milchvieh- und Mutterkuhhaltung ausgewertet wurden, ergibt sich bundesweit, dass

- 54,6 % der 5.878 einbezogenen spezialisierten Jungrinderaufzuchtbestände und
- 8,6 % der 35.437 analysierten Rindermastbestände BHV1-frei sind.

Hinsichtlich der einzelnen Bundesländer hat Bayern mit 91 % bei den Beständen und 87,1 % bei den Rindern im BHV1-freien Bereich den Spitzenplatz, während Mecklenburg-Vorpommern mit 39,5 % bzw. 15,2 % das Schlusslicht bildet.

Anders stellt sich hingegen die Situation in den Ländern bezüglich der in BHV1-Sanierung befindlichen Bestände und Rinder dar. Besonders in den ostdeutschen Bundesländern ist der prozentuale Anteil der in Sanierung befindlichen Bestände und Rinder auf Grund der Großbestände höher als in den Altbundesländern. So stehen beispielsweise in Mecklenburg-Vorpommern 56,8 % der Bestände und 84,3 % der Rinder in BHV1-Sanierung.

Erhöhte Anstrengungen sind hinsichtlich der BHV1-Bekämpfung v.a. in den Bundesländern Rheinland-Pfalz, Nordrhein-Westfalen und dem Saarland notwendig, wo sich 29,6 %/33,8 %; 22,3 %/21,2 % bzw. 27 %/15,7 % der Bestände/Rinder in der Kategorie „Sonstige Bestände“, d.h. ohne gezielte BHV1-Bekämpfung, wieder finden.

Die zeitweilige Unvollständigkeit in der Berichterstattung einiger Bundesländer gestattet lediglich Trenderkennungen. Der ausgewiesene Bekämpfungsfortschritt ist demzufolge unter Vorbehalt zu betrachten. Weiterhin deutet sich an, dass die im Berichtsbogen aufgeführten BHV1-Kategorien in den Bundesländern unterschiedlich interpretiert werden. Ausführungshinweise zur Berichterstattung könnten hier Abhilfe schaffen. Dies gilt auch zukünftig, wenn die Berichterstattung entsprechend den Anforderungen der EU entweder nach der Entscheidung 2003/886/EG oder 2004/450/EG erfolgen soll.

Epidemiologische Untersuchung von Risikofaktoren für BHV-1 in Milchviehbetrieben in Niedersachsen

Teuffert, J.*, Pötzsch, C.J. und Wiedl, K

Das Ziel dieser Fall-Kontroll-Studie ist es, die Risikofaktoren für das Auftreten der BHV-1 in Milchviehbetrieben in Niedersachsen aufzuzeigen. Während des ersten Jahres wurden ca. 80 Problem- und Kontrollbetriebe in fünf Landkreisen ausgewählt. Die Daten dieser Betriebe wurden mit Hilfe eines Fragebogens gesammelt. Diese Daten setzen sich aus Betriebsdaten, aus Angaben zum Management und den Tieren sowie aus Informationen zur Krankheitsgeschichte und der BHV1-Überwachung zusammen.

Folgende Zwischenergebnisse sind festzuhalten:

- Gegenwärtig ist die Impfung der Reagenten nahezu die einzige Vakzinierung, die in den Betrieben praktiziert wird. Jedoch muss die Impfstrategie (Reagentenimpfung, Gesamtbestandsimpfung, Alter der Tiere bei Erstimpfung) an die BHV1-Situation des jeweiligen Betriebes angepasst werden. Die Bekämpfung der BHV1 sollte flächendeckend erfolgen.
- Reagenten sollten zeitnah aus dem Betrieb entfernt werden.
- Die Dokumentation durchgeführter Impfungen sowie die erzielten labordiagnostischen Untersuchungsergebnisse sind insbesondere im Hinblick auf die Kontrolle des Sanierungserfolges in den Betrieben zu verbessern.
- Veterinärhygienische Schutzmaßnahmen, einschließlich Quarantäne, bedürfen einer strikten Einhaltung.

Im Jahre 2005 wird die Datenerfassung beendet sein. Die Daten werden analysiert und die Ergebnisse der Studie veröffentlicht.

TSN – bundeseinheitliches Werkzeug zum Krisenmanagement von Tierseuchen

Klöß, D., Kramer, M., Kroschewski, K., Micklich, A., Schröder, R.* und Staubach, C.

Im Jahr 2004 wurde die Version 2.3 des Tierseuchennachrichtensystems fertig gestellt und an die für das Veterinärwesen zuständigen Behörden aller Verwaltungsebenen verteilt. In dieser Version wurden die geografischen Funktionen erweitert bzw. die Bedienerfreundlichkeit stark verbessert. Das bezieht sich im Besonderen auf Funktionalitäten zum Einfärben von Karten und das Zeichnen von Sperr- und Beobachtungsgebieten anhand von natürlichen Grenzen (Polygoneditor). Die Betriebsdatei wurde erweitert, so dass Betriebstypen nach bundeseinheitlichen Katalogen und Sanierungsstände verschiedener Tierseuchen gespeichert und ausgewertet werden können. Um TSN effektiv in Kreis-übergreifenden Krisenzentren einsetzen zu können, wurden neue Funktionen zum Datenaustausch implementiert. Im Jahr 2004 wurden drei Stammdatenaktualisierungen durchgeführt, wodurch TSN an verschiedene Neuerungen der Tierseuchengesetzgebung angepasst wurde. Im Bereich der Zentralen Tierseuchendatenbank (TSN-Online) wurde die Adressverwaltung überarbeitet. Des Weiteren wurde ein spezieller Bereich „Krisenmanagement“ eingerichtet, der die Arbeit der Arbeitsgruppen für die Fortentwicklung des „bundeseinheitlichen Tierseuchenbekämpfungshandbuches“ unterstützt.

Im Januar/Februar wurde eine Bedarfsermittlung für TSN-Schulungen durchgeführt. Auf deren Grundlage wurde ein Schulungskonzept entwickelt und umfangreiche Schulungsunterlagen erstellt. Im Folgenden wurden neun TSN-Schulungen (vier Einsteiger und fünf Fortgeschrittene) in Wusterhausen und fünf externe Schulungen durchgeführt. Ingesamt wurden mehr als 300 Mitarbeiter der Veterinärämter und übergeordneter Einrichtungen geschult.

Weitere Projekte

Bearbeitung und Aktualisierung veterinärmedizinischer Nomenklaturen als Voraussetzung einer standardisierten Datenerfassung, für den Datenaustausch mit anderen Projekten und zur Erfüllung nationaler und internationaler Berichtspflichten
Klöß, D., Kroschewski, K.*, Micklich, A. und Schröder, R.

Sicherstellung und Automatisierung der Konsistenz der zentralen Tierseuchendatenbank
Klöß, D., Kroschewski, K.*, Micklich, A. und Schröder, R.

Aufbau einer topografisch-kartografischen Datenbank für Deutschland basierend auf den Vektor- und Rasterdaten des Bundesamtes für Kartografie und Geodäsie und der Vermessungsämter der Länder
Klöß, D., Schröder, R. und Staubach, C.*

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. Es integriert das bisherige ANIMO-System (ANImal MOvement) mit dem zu etablierenden SHIFT-System (System to assist with the Health controls of Import of items of veterinary concern at Frontier inspection posts from Third countries). Mit Hilfe dieses Systems soll die Kontrolle und Rückverfolgbarkeit von Tiertransporten und Transporten tierischer Produkte verbessert werden, sowie für die veterinärmedizinischen Grenzkontrollstellen eine Entscheidungshilfe beim Import von Tieren und Produkten tierischer Herkunft sein. Es stellt als Web-Anwendung schnelle und aktuelle Informationen für die zuständigen Veterinärbehörden bereit und soll zukünftig eine elektronische Zertifizierung ermöglichen. Nach einer Übergangsphase im Jahre 2004 sind ab 01.01.2005 alle Mitgliedsstaaten verpflichtet, TRACES anzuwenden (Entscheidung 2004/292/EG der Kommission vom 30.03.2004).
Für die technische Umsetzung und Betreuung ist auf Bundesebene das FLI zuständig (Bezeichnung innerhalb von TRACES „Memberstate Administrator").

Weiteres Projekt

Erarbeitung eines Konzeptes für die IT-Ausstattung eines Mobilen Tierseuchenbekämpfungszentrums
Micklich, A.

Bewertung der relativen Genauigkeit datenbasierter Vorhersagen
Ziller, M.*

In Risikobewertungen und vielen weiteren Untersuchungen spielen datenbasierte Vorhersagen eine wesentliche Rolle. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass Simulationen oder auch experimentelle Studien häufig auf der Basis einer zu geringen Datengrundlage durchgeführt werden. Trotzdem werden daraus teilweise weit reichende Schlussfolgerungen gezogen und

Vorhersagen getroffen, ohne deren Unsicherheit zu berücksichtigen. Deshalb sind unabhängige Methoden erforderlich, die die Aussagequalität bzw. Sicherheit der Schlussfolgerungen und Prognosen unter diesen Bedingungen quantifizieren
Im Ergebnis theoretischer Untersuchungen konnten Maße für die relative Genauigkeit datenbasierter Vorhersagen entwickelt werden. Anhand verschiedener Beispiele konnte demonstriert werden, dass die Verwendung dieser Maße eine präzisere und objektivierte Interpretation der Ergebnisse aus Vorhersagestudien ermöglicht. Ferner wurde die Wirkung von Ausreißern auf die Vorhersagequalität theoretisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das in der Praxis häufig verwendete Weglassen von Ausreißern nur scheinbar zu einer genaueren Vorhersage führt. Tatsächlich wird dadurch aber der Zeithorizont für eine akzeptable Vorhersage verkürzt.

Nutzung ungenauer Informationen und qualitativer Daten in der Risikobewertung
Czech, D., Hilberath, K., Selhorst, T., Vesely, J. und Ziller, M.*

In der Veterinärepidemiologie sind häufig die erforderlichen Informationen für eine klassische quantitative Risikoanalyse nicht oder nur sehr unpräzise vorhanden. Deshalb müssen alternative Methoden verwendet bzw. entwickelt werden, die zu klaren, reproduzierbaren und nachvollziehbaren Risikobewertungen führen. Für die Risikomodellierung bedeutet dies das Einbeziehen von qualitativen Daten (kategoriale Bewertungen) und unscharfen Zahlen, um Expertenmeinungen und andere unpräzise Informationen abbilden zu können.
In verschiedenen Beispielen konnte demonstriert werden, dass eine Transformation unscharfer Zahlen und qualitativer Daten in Wahrscheinlichkeitsdichten geeignet ist, sehr komplexe und gemischte Modelle in stochastische Modelle zu überführen. Mit entsprechenden Simulationstechniken kann dann das Ergebnis und seine Variabilität abgeschätzt werden. Damit ist es möglich, alle verfügbaren Angaben in ihrer vorliegenden Qualität in Risikobewertungen einzubeziehen und zusätzliche Informationsverluste zu vermeiden.

10 BEHÖRDLICHE AUFGABEN UND DIAGNOSTIK

10.1 Zulassungen und Chargenprüfungen

Das FLI ist nach dem Tierseuchengesetz, der Tierimpfstoff-Verordnung sowie dem Gesetz zur Neuorganisation des gesundheitlichen Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit vom 06. August 2002 als Bundesoberbehörde für die Zulassung und Chargenfreigabe von Sera, Impfstoffen und Diagnostika zuständig, soweit nicht das Paul-Ehrlich-Institut zuständig ist.

10.1.1 Zulassung und Prüfung von Impfstoffen und anderen Mitteln nach der Tier-Impfstoffverordnung

Produkt	Menge	Zweck	Personen	Standort
MKS-Diagnostik-ELISA	1	Fachliche Beurteilung eines Antrags auf Zulassung	B. Haas	Insel Riems
MKS-Impfstoffe	7	Chargenfreigabe	B. Haas	Insel Riems
ELISA Avian Pneumovirus	1	Laborprüfung für die Zulassung	O. Werner	Insel Riems
ELISA Avian Pneumovirus	3	Chargenprüfung	O. Werner	Insel Riems
BVDV-Antikörper und –Antigen-ELISA	15	Zulassung und Chargenprüfung	M. Beer H. Schirrmeier	Insel Riems
BHV-1-Antikörper-ELISA	21	Zulassung und Chargenprüfung	M. Beer	Insel Riems
CSFV-Antikörper-ELISA	16	Chargenprüfung	K. Depner	Insel Riems
CSFV-Konjugat (Immunfluoreszenz)	1	Chargenprüfung	K. Depner	Insel Riems
CSFV-Vakzine	3	Chargenprüfung	K. Depner	Insel Riems
CSFV-Oralvakzine (Versuchsmuster) für Wildschweine	7	Prüfung auf Wirksamkeit	E. Lange V. Kaden	Insel Riems
Aujeszky-ELISA zum Nachweis von Antikörpern	5	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Chargenprüfung	T. Müller	Wusterhausen
Aujeszky-ELISA zum Nachweis von Antikörpern	5	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Chargenprüfung	T. Müller	Wusterhausen
BLV ELISA	2	Laborprüfung nach Änderungsanzeige	D. Beier	Wusterhausen
Fasciola-ELISA	1	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Chargenprüfung	G. Schares	Wusterhausen
Giardia SNAP ELISA	1	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Zulassung	K. Tackmann	Wusterhausen

Produkt	Menge	Zweck	Personen	Standort
Kryptosporidien-ELISA	1	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Chargenprüfung	K. Tackmann	Wusterhausen
Neospora-ELISA	2	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Chargenprüfung	G. Schares	Wusterhausen
Q-Fieber-ELISA	1	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Chargenprüfung	K. Henning	Wusterhausen
Sarcoptes-ELISA, Schwein	2	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Chargenprüfung	K. Tackmann	Wusterhausen
Sarcoptes-ELISA, Hund	2	Laborprüfung und Prüfbericht im Rahmen der Chargenprüfung	K. Tackmann	Wusterhausen
Toxoplasma-ELISA, kleine Wiederkäuer	1	Chargenprüfung	K. Tackmann	Wusterhausen
Verotoxin-Nachweis	1	Chargenprüfung	L. Geue	Wusterhausen
Malleus-KBR-Antigen (Rotzdiagnostik)	1	Chargenprüfung	A. Raßbach	Jena
Ascoli-Test Antigen (Milzbranddiagn.)	1	Zulassung	A. Raßbach	Jena
Ascoli-Test Positivserum für die Milzbranddiagnostik	1	Zulassung	A. Raßbach	Jena
Salmonella ELISA	2	Zulassung	U. Methner	Jena
Salmonella ELISA	5	Chargenprüfung	U. Methner	Jena
Salmonella ELISA	1	Laborprüfung nach Änderungsanzeige	U. Methner	Jena
CHECKIT-APP-ApxIV (Actinobacillus-pleuropneuminiae-Antikörper-ELISA beim Schwein)	3	Chargenprüfung	M. Heller	Jena
CHECKIT-APP-ApxIV (Actinobacillus-pleuropneuminiae-Antikörper-ELISA beim Schwein)	1	Laborprüfung nach Änderungsanzeige	M. Heller	Jena
SVANOVIR Paratuberkulose ELISA	4	Chargenprüfung	H. Köhler	Jena
Pourqier Paratuberkulose-ELISA	2	Chargenprüfung	H. Köhler	Jena

Produkt	Menge	Zweck	Personen	Standort
PCR-Kit *Taylorella equigenitalis*	1	Zulassung	F. Melzer H.Hotzel	Jena
IFT-Kit *Taylorella equigenitalis*	1	Zulassung	F. Melzer	Jena
ELISA Brucellose	1	Zulassung	F. Melzer	Jena
ELISA Brucellose	5	Chargenprüfung/ Änderungsanzeige	F. Melzer	Jena
SLA-Antigen Brucellose	1	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
KBR-Antigen Brucellose	1	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
RBT-Antigen Brucellose	1	Chargenprüfung	F. Melzer	Jena
FASTest BCV Strip ad us. vet.	1	Chargenprüfung	P. Otto	Jena
Mega Screen FLUO FCoV	2	Chargenprüfung	P. Otto	Jena
BIO-X Digestive ELISA Kit	1	Chargenprüfung	P. Otto	Jena
BGVV-B 245 (ELISA Chlamydia psittaci)	2	2 x Chargenfreigabe	E. Schubert	Jena
BGVV-B 247 (ELISA Mycoplasma hyopneumonia)	2	1 x Chargenfreigabe 1 x Änderungsanzeige und Chargenfreigabe	E. Schubert	Jena
BGVV-B 235 (PCR-Test *Mycoplasma gallisepticum*)	2	2 x Chargenfreigabe	H. Hotzel	Jena
BFAV-B 381 PCR-Test *Brachyspira* spec.	1	Amtliche Zulassung	H. Hotzel	Jena
FLI-B 382 (PCR-Test *Taylorella equigenitalis*)	2	Amtliche Zulassung Chargenfreigabe	H. Hotzel	Jena

siehe auch Berichte der nationalen Referenzlaboratorien

10.2 Diagnostische Untersuchungen

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Teschovirus-Isolate v. Haus- und Wildschwein	18	Bestätigung und Typisierung	hoheitlich	18 x positiv PTV in 3 Serotypen	M. Dauber	Insel Riems
Seren v. Schweinen	12	Untersuchung auf neutralisierende Ak gegen PEV-A und PEV-B	hoheitlich	12 x negativ	M. Dauber	Insel Riems
Kotprobe v. Schwein	1	Nachweis von Teschovirus (PCR)	hoheitlich	negativ	M. Hammer H. Schirrmeier	Insel Riems
Organproben v. Schweinen	6	Untersuchung auf PTV, PEV-A und PEV-B (Virusisolierung, PCR)	hoheitlich	6 x negativ	M. Dauber H. Schirrmeier	Insel Riems
Organe v. Schwein	15	PCV2-Nachweis		10 x positiv	H. Schirrmeier	Insel Riems
Organe v. Wisent	7	OHV2-Nachweis		2 x positiv	H. Schirrmeier J. Teifke	Insel Riems
Seren v. Schaf, Ziege, Bison u. Rind	28	OHV2-Genom- und AK-Nachweis		2 x AK pos 1 x PCR pos.	H. Schirrmeier B. Hoffmann (U. Ziegler)	Insel Riems
Organe v. Wildvögeln (Möve, Eiderente, Kranich)	14	WNFV-Nachweis		negativ	H. Schirrmeier B. Hoffmann	Insel Riems
Virusisolat v. Schaf	1	Charakterisierung		BDV	H. Schirrmeier	Insel Riems
Seren v Rindern	18	BHV2-AK-Nachweis		negativ	H. Schirrmeier	Insel Riems
Organe v. Schwein	15	Untersuchung auf TK	Export	negativ	H. Schirrmeier M. Dauber	Insel Riems
Leber v. Kaninchen	22	RHDV-Nachweis		14 x pos.	H. Schirrmeier H. Granzow	Insel Riems
Leber v. Feldhasen	39	EBHSV-Nachweis		28 x positiv	H. Schirrmeier H. Granzow	Insel Riems
Viruisolate v. Rind	6	Charakterisierung, Genotypisierung	hoheitlich	3x BVDV2	H. Schirrmeier G. Strebelow	Insel Riems
Seren v. Rind	12	BVDV-Nachweis und Charakterisierung	hoheitlich	12 x BVDV1b	H. Schirrmeier G. Strebelow	Insel Riems
Seren v. Rind	39	BVDV-Ak-Nachweis	hoheitlich	4 x positiv	H. Schirrmeier	Insel Riems
Organe v. Kaninchen	21	Myxomatoseverdacht		positiv	H. Schirrmeier	Insel Riems
Verdachtsfälle	3	MKS-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	negativ	B. Haas	Insel Riems
Seren v. Menschen	1	MKS-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	negativ	B. Haas	Insel Riems
Seren v. Tieren	34	Untersuchung auf MKS-Ak	Im/Export	negativ	B. Haas	Insel Riems

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Spermaproben v. Rind	1	Untersuchung auf MKS-Ak	Export	negativ	B. Haas	Insel Riems
Verdachtsfälle	1	SVD-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	negativ	B. Haas	Insel Riems
Seren v. Schwein	164	Untersuchung auf SVD-Ak	Export	negativ	B. Haas	Insel Riems
Seren v. Pferd	175	Untersuchung auf VSV-Ak	Export	negativ	B. Haas	Insel Riems
BHV-1 Isolate	39	Charakterisierung	hoheitllich		M. Beer	Insel Riems
Serum/Plasma v. Rind	1964	BHV-1- Diagnostik	hoheitllich		M. Beer	Insel Riems
Seren v. Rind	1250	BHV-1-gE-Diagnostik	hoheitllich		M. Beer	Insel Riems
Nasentupfer v. Rind	3	Verdacht auf BHV-1	hoheitlich		M. Beer	Insel Riems
Milchproben v. Rind	33	BHV-1-Antikörper	Amtshilfe		M. Beer	Insel Riems
Spermaproben	1	BHV-1	Amtshilfe	negativ	M. Beer	Insel Riems
Organpoole	2	BHV-1	hoheitlich	positiv (BHV-1 Wildtyp)	M. Beer	Insel Riems
Aphtenmaterial, Aspirat, Haut	3	BHV-1	Amtshilfe	negativ	M. Beer	Insel Riems
Virusisolate v. Geflügel und Vögeln	120	Identifizierung und Charakterisierung	hoheitlich	66 x PMV-1 16 x PMV-2 25 x PMV-3 2 x AIV H3N8 4 x Adenovirus 2 x Reovirus 2 x Pockenvirus 1 x Herpesvirus	O. Werner E. Starick H. Granzow	Insel Riems
Organe v. Puten	8	Verdacht auf aviäre Influenza	hoheitlich	8 x negativ	O. Werner E. Starick	Insel Riems
Organe oder Tupfer v. Hühnern	35	Verdacht auf aviäre Influenza oder ND	hoheitlich	35 x negativ	O. Werner E. Starick	Insel Riems
Organe oder Tupfer v. Enten u. Gänsen	46	Verdacht auf aviäre Influenza	hoheitlich	46 x negativ	O. Werner E. Starick	Insel Riems
Tauben	12	Verdacht auf ND	hoheitlich	12 x virusnegativ 12 x seropositiv	O. Werner E. Starick J. Teifke	Insel Riems
Kraniche	27	Verdacht auf aviäre Influenza	hoheitlich	27 x negativ	O. Werner E. Starick J. Teifke	Insel Riems
Kotproben v. Papageien/Sittichen	29	Untersuchung auf Freisein von AIV und NDV	Export	29 x negativ	O. Werner E. Starick	Insel Riems
Seren v. Puten	5	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	Amtshilfe	5 x negativ	O. Werner	Insel Riems

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Seren v. Hühnern	89	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	Amtshilfe	12 x positiv (H1) 77 x negativ	O. Werner	Insel Riems
Seren v. Gänsen	24	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	hoheitlich	24 x negativ	O. Werner	Insel Riems
Seren v. Straußen	5	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	Amtshilfe	5 x positiv (H7)	O. Werner E. Starick	Insel Riems
Seren v. Tauben	6	Untersuchung auf Antikörper gegen NDV	hoheitlich	6 x positiv	O. Werner	Insel Riems
EDTA-Blut	2	Virusisolierung KSPV	hoheitlich	negativ KSPV	K. R. Depner	Insel Riems
Seum/Plasma	21	Antikörpernachweis KSP (Differentialdiagnostik KSP)	hoheitlich	negativ KSP positiv BVD/BD	K. R. Depner	Insel Riems
Seren v. Mensch	1	Untersuchung auf PrV-spezifische Ak AK-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	1 x negativ	T. Müller	Wusterhausen
Seren v. Hausschweinen	22	Untersuchung auf PrV-spezifische Ak AK-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	15 x gB positiv gE negativ	T. Müller	Wusterhausen
	19	serologischer Test AHS-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	19 x negativ	M. Büttner	Tübingen
	333	serologischer Test Bluetongue (BT)-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	333 x negativ	M. Büttner	Tübingen
	21	Virusisolierung und PCR-Prüfung BT-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	21 x negativ	M. Büttner	Tübingen
Organhomogenisate und Isolate von Forellen	6	Virusisolierung, -identifizierung und Genomnachweis	hoheitlich	2 x VHSV 4 x negativ	D. Fichtner P.-J. Enzmann S.M. Bergmann	Insel Riems
VHSV- und IHNV-Isolate von Regenbogenforellen	15	molekulare Analyse (Sequenzierung der G- und NV-Gene)	hoheitlich	Molekulare Epizootiologie und Einordnung in genet. Stammbaum	P.-J. Enzmann D. Fichtner	Insel Riems
Eier vom Lachs	7	Ausschluss ISAV	hoheitlich	Virusgenom der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV) nicht nachweisbar	D. Fichtner S.M. Bergmann	Insel Riems

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Organe und Isolat vom Aal	2	Virusisolierung, -identifizierung und Genomnachweis	hoheitlich	1 x Herpesvirus anguillae (HVA), Anuillid Herpesvirus (AngHV) 1 x Eel Virus European X (EVEX)	S.M. Bergmann D. Fichtner H. Granzow	Insel Riems
Lebende Karpfen und Organproben von Karpfen	4	Genomnachweis	hoheitlich	4 x Koi-Herpesvirus (KHV)	S.M. Bergmann D. Fichtner	Insel Riems
Lebende Koi-Karpfen und Organproben von Koi-Karpfen	6	Genomnachweis	hoheitlich	5 x Koi-Herpesvirus (KHV), 1 x negativ	S.M. Bergmann D. Fichtner	Insel Riems
Organproben vom Wels	1	Virusisolierung, -identifizierung und Genomnachweis	hoheitlich	Wels-Iridovirus (European Sheatfish Virus, ESV)	D. Fichtner S.M. Bergmann H. Granzow	Insel Riems
Organproben von verschiedenen Zierfischen	7	Virusisolierung und Genomnachweis	hoheitlich	7 x negativ	S.M. Bergmann	Insel Riems
Organproben von Wildfischen (Bachforellen, Güster, Plötze)	9	Virusisolierung und Genomnachweis	hoheitlich	9 x negativ	D. Fichtner H. Granzow H. Schütze	Insel Riems
Allantois-Flüssigkeit/ Kulturüberstand	34	AIV, PMV-1 (NDV) einschl. Subtypisierung RT-PCR-Tests, NI Assay, Sequenzierung	2x Import 8x Amtshilfe 14x hoheitlich	21 x AIV 14 x PMV-1	E. Starick O. Werner	Insel Riems
Organe/Tupfer/Kot	56					Insel Riems
Anderes	11					Insel Riems
Lymphknoten vom Rind	1	Histopathologie	Amtshilfe	Lymphosarkom	J.P. Teifke D. Beier	Insel Riems
Euter vom Schaf	1	Histopathologie	Amtshilfe	Proliferative Dermatitis, Verdacht auf Orf	J.P. Teifke H. Schirrmeier	Insel Riems
Organe vom Bison	4	Histopathologie	Amtshilfe	Bösartiges Katarrhalfieber	J.P. Teifke	Insel Riems
Organe vom Rind	3	Histopathologie	Amtshilfe	Myeloische Leukose	J.P. Teifke D. Beier	Insel Riems
Organe vom Rind	3	Histopathologie	Amtshilfe	T-Zell-Leukose	J.P. Teifke D. Beier	Insel Riems
Organe vom Rind	2	Histopathologie	Amtshilfe	Autolyse	J.P. Teifke D. Beier	Insel Riems
Rehbock	1	Obduktion	Amtshilfe	Trauma	J.P. Teifke	Insel Riems

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Chargenprüfungen	2	CSFV-Diagnostik – FAT am Kryoschnitt	hoheitlich	Bio275 und CSFV-FITC Konjugat	J.P. Teifke K.R. Depner	Insel Riems
CSFV-Isolate vom Wildschwein	2	Typisierung	hoheitlich	2 Genotypen 2 Phänotypen	H.-G. Strebelow V. Kaden	Insel Riems
Organe, Blut etc. vom Wildschwein	1	CSFV-Diagnostik	hoheitlich	1 x positiv	V. Kaden H.-G. Strebelow	Insel Riems
Seren von Wildschweinen	50	CSFV-Diagnostik	hoheitlich	44 x KSP-positiv	V. Kaden	Insel Riems
Seren von Wildschweinen	4	Pestivirus-Diagnostik	hoheitlich	4 x KSP-positiv	V. Kaden K.R. Depner	Insel Riems
Seren v. Rind	452	Untersuchung BLV Antikörper	hoheitlich	386 x negativ 26 x inkonkl. 40 x positiv	D. Beier	Wusterhausen
Seren v. Rind	5	Untersuchung BLV Antikörper	Import	5 x positiv	D. Beier	Wusterhausen
Milchproben	6	Untersuchung BLV Antikörper	hoheitlich	2 x negativ 1 x fraglich 3 x positiv	D. Beier	Wusterhausen
EDTA-Blut, Rind	259	BLV-Nachweis PCR	hoheitlich	244 x negativ 14 x positiv	D. Beier	Wusterhausen
EDTA-Blut, Rind	1	BLV-Nachweis PCR	Import	negativ	D. Beier	Wusterhausen
Gewebe Rind	8	BLV-Nachweis PCR	hoheitlich	8 x negativ	D. Beier	Wusterhausen
Seren v. Schafen	22	Untersuchung MVV-Antikörper	amtlich	diverse	D. Beier	Wusterhausen
Seren v. Ziegen	7	Untersuchung CAEV-Antikörper	amtlich	7 x negativ	D. Beier	Wusterhausen
Seren v. Rhesusaffen	3	Untersuchung auf virusneutralisierende Tollwut-Ak	hoheitlich	3 x negativ	T. Müller	Wusterhausen
Seren v. Pavianen	1	Untersuchung auf virusneutralisierende Tollwut-Ak	hoheitlich	2 x negativ	T. Müller	Wusterhausen
Seren v. Hunden (Proficiency Testing of dog and cat sera, ring test)	22	Untersuchung auf virusneutralisierende Tollwut-Ak	hoheitlich	3 x positiv	T. Müller	Wusterhausen
Seren v. Hunden (Proficiency Testing)	3	Untersuchung auf virusneutralisierende Tollwut-Ak	hoheitlich	3 x positiv	T. Müller	Wusterhausen
Humane Seren	524	Untersuchung auf virusneutralisierende Tollwut-Ak	hoheitlich	477 x positiv	T. Müller	Wusterhausen
Corneaabstrich Mensch	1	TW-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	1 x negativ	T. Müller	Wusterhausen
Gehirn Mensch	2	TW-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	1 x positiv	T. Müller	Wusterhausen
Liquor Mensch	6	TW-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	6 x negativ	T. Müller	Wusterhausen

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Speichel v. Menschen	5	TW-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	5 x negativ	T. Müller	Wusterhausen
Gehirn Hyänen	6	TW-Verdachtsdiagnostik	hoheitlich	4 x positiv	T. Müller	Wusterhausen
Gehirn Fuchs	4	TW-Bestätigung	hoheitlich	4 x positiv	T. Müller	Wusterhausen
Tollwut Feldisolate	10	Typisierung	hoheitlich	4 x Genotyp 1 6 x Genotyp 5 (EBLV-1)	T. Müller	Wusterhausen
Campylobacter-Isolate	37	Differenzierung	hoheitlich	23 x *C. fetus* ssp. *venerealis*, 3 x *C. fetus* ssp. *fetus*, 5 x negativ	F. Schulze W. Müller	Jena
Lungengewebe, Trachea, Körperflüssigkeit (alles von einer verendeten Kuh)	jeweils 1	Abklärung Lungenseuche-Verdacht	hoheitlich	negativ	R. Haß M. Heller A. Hinsching H. Hotzel E. Schubert	Jena
Seren Rind	65	Abklärung nicht negativer Befunde (Brucellose)	hoheitlich	65 x negativ	F. Melzer	Jena
Seren Schwein	38	Abklärung nicht negativer Befunde (Brucellose)	hoheitlich	38 x negativ	F. Melzer	Jena
Seren Schaf/Ziege	20	Abklärung nicht negativer Befunde (Brucellose)	hoheitlich	20 x negativ	F. Melzer	Jena
Seren Alpaka	4	Abklärung nicht negativer Befunde (Brucellose)	hoheitlich	4 x negativ	F. Melzer	Jena
Serum Zwerghirsch	1	Abklärung nicht negativer Befunde (Brucellose)	hoheitlich	1 x negativ	F. Melzer	Jena
Serum Wildschwein	1	Abklärung nicht negativer Befunde (Brucellose)	hoheitlich	1 x Brucella-AK	F. Melzer	Jena
Seren Schaf/Ziege	56	Untersuchung auf *B. ovis* – Antikörper	Export	56 x negativ	F. Melzer	Jena
Seren Hund	6	Untersuchung auf *B. canis* – Antikörper	Export	6 x negativ	F. Melzer	Jena
Isolat vom Schwein	1	Diagnose/Differenzierung	hoheitlich	1 x negativ	F. Melzer	Jena
Isolat vom Wildschwein	1	Diagnose/Differenzierung	hoheitlich	1 x *Brucella suis* Biovar 2	F. Melzer	Jena
Seren von Pferden	15	Rotzverdachtsdiagnostik (Antikörperbestimmung)	hoheitlich	negativ	A. Raßbach J. Gottschaldt	Jena
Seren von Pferden	91	Untersuchung auf Rotz-Antikörper	hoheitlich	negativ	A. Raßbach	Jena

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Lederlappenproben	11	Untersuchung auf Milzbrandsporen	Amtshilfe	negativ	A. Raßbach W. Müller	Jena
Reovirushaltige Zellkulturüberstände	15	Ausschluss von Rotaviren durch Isolierungsversuche in Zellkultur, Immunofluoreszenztest, PCR und PAGE	Amtshilfe	15 x negativ	P. Otto M. Elschner	Jena
Darminhalt von Broilerküken	37	Nachweis von Rotaviren mittels PAGE und PCR	Amtshilfe	6 x gp D Rotaviren 1 x gp F Rotaviren 11 x gp A Rotaviren 1 x Reoviren	P. Otto M. Elschner	Jena
Gewebe vom Rind (93 Tiere)	207	TB-Verdacht	Amtshilfe	85 x M. bovis/caprae 3 x M. av. hominissuis 1 x M. mucogenicum 9 x offen 75 x keine	I. Moser H. Hotzel	Jena
Mykobakterien-Isolate vom Rind	3	Differenzierung	Amtshilfe	3 x M. avium ssp. paratuberculosis (Map)	H. Köhler	Jena
Mykobakterien-Isolate von Milchfiltern	1	Differenzierung	Amtshilfe	noch offen	H. Köhler	Jena
Mykobakterien-Isolate von Zootieren	8	Differenzierung	Amtshilfe	3 x M. av. hominissuis 1 x M. intracellulare 1 x M. gordonae Type IV 2 x M. mucogenicum o. M. chelonae 1 x M. kansasij	H. Köhler P. Möbius	Jena
Mykobakterien-Isolate von Rindern und Schafen	23	Typisierung mittels RFLP IS*900*	Amtshilfe	verschiedene Typen	H. Köhler P. Möbius	Jena
Kot-/Organproben vom Rind	39	Mykobakterien-Nachweis	Amtshilfe	18 x negativ 14 x Map 1 x M. avium ssp. hominissuis 6 x noch offen	H. Köhler	Jena
Kotproben von Rot- und Rehwild	22	Mykobakterien-Nachweis	Amtshilfe	noch offen	H. Köhler	Jena

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Gewebe vom Schwein (138 Tiere)	140	Verdacht auf Mykobakteriose	Amtshilfe	1 x M. tuberc. Komplex 5 x M. av. avium 95 x M. av. hominissuis 24 x offen 4 x keine M.	I. Moser	Jena
Gewebe vom Huhn (14 Tiere)	23	Verdacht auf Geflügeltuberkulose	Amtshilfe	17 x M. av. avium 2 x M. av. hominissuis 1 x offen 3 x keine M.	I. Moser	Jena
Heim- und Zootiere:						
Katze (6 Tiere)	6	Verdacht auf Mykobakteriose TB-Verdacht	Amtshilfe	1 x M. microti 1 x M. av. hominissuis 4 x keine M.	I. Moser H. Hotzel	Jena
Hund (2 Tiere)	7	TB-Verdacht	Amtshilfe	2 x M. tuberculosis 5 x M. av. hominissuis	I. Moser H. Hotzel	Jena
Elefant (1 Tier)	5	TB-Verdacht	Amtshilfe	4 x M. av. hominissuis 1 x keine	I. Moser H. Hotzel	Jena
Vögel (Fasan, Reiher, Taube; 8 Tiere)	10	Verdacht auf Geflügeltuberkulose	Amtshilfe	4 x M. av. avium 1 x M. av. hominissuis 5 x keine	I. Moser H. Hotzel	Jena
Wechselwarme (Python, Chamäleon, Schildkröte, Frosch; 6 Tiere)	7	Mykobakteriose	Amtshilfe	1 x M. chelonae 1 x M. gordonae 5 x keine	I. Moser H. Hotzel	Jena
Andere: Torf Futter Wasser	 1 7	Verdacht auf Mykobakterien	Amtshilfe	 1 x M. av. avium 1 x M. av. hominissuis 1 x M. concordense	I. Moser H. Hotzel	Jena
Milch/Euter	1 5	Verdacht auf Mykobakterien	Amtshilfe	1 x M. mageritense 1 x M. gordonae 1 x M. smegmatis 1 x M. fortuitum 7 x keine	I. Moser H. Hotzel	Jena
Mykobakterienstämme aus:						
Gewebe	11	TB-Verdacht	Amtshilfe	11 x M. bovis/caprae	I. Moser H. Hotzel P. Möbius	Jena

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Milch/Milchfilter	35	Mykobakteriose	Amtshilfe	14 x M. smegmatis 4 x M. fortuitum 1 x M. hassiacum 3 x M. flavescens 13 x keine	I. Moser H. Hotzel P. Möbius	Jena
Schwein	30	Mykobakteriose	Amtshilfe	4 x M. av. avium 20 x M av. hominissuis 6 x unspez. M. 1 x M. hominissuis	I. Moser H. Hotzel P. Möbius	Jena
Torf	1	Mykobakteriose	Amtshilfe	1 x M. hominissuis	I. Moser H. Hotzel P. Möbius	Jena
Blutserum v. Pferd (Antikörpernachweis) Präpuzialspülprobe (Erregernachweis)	55 1	Verdacht auf Beschälseuche	Amtshilfe	Serumtiter (KBR): negativ: 38 Proben ≥ 1:5: 12 Proben davon ≥ 1:10: 5 Proben kein Erregernachweis	I. Moser K. Henning	Jena Wusterhausen
Gewebe v. Menschen	8	Psittakose-Verdachtsdiagnose	hoheitlich	1 x C. psittaci	H. Hotzel	Jena
Sputum v. Menschen	42	Psittakose-Verdachtsdiagnose	hoheitlich	1 x C. psittaci	H. Hotzel	Jena
Liquor v. Menschen	27	Psittakose-Verdachtsdiagnose	hoheitlich	2 x C. psittaci 2 x C. trachomatis	H. Hotzel	Jena
Kotproben v. Vögeln	2	Psittakose-Verdachtsdiagnose	hoheitlich	2 x Chlamydien	H. Hotzel	Jena
Tupfer v. Rind	50	Untersuchung auf Chlamydien	Amtshilfe	5 x Chlamydien 4 x C. psittaci	E. Schubert H. Hotzel	Jena
Organmaterial v. Rind	13	Untersuchung auf Chlamydien	Amtshilfe	7 x Chlamydien	E. Schubert H. Hotzel	Jena
Milch v. Rind	38	Untersuchung auf Chlamydien	Amtshilfe	13 x Chlamydien 11 x C. psittaci	H. Hotzel E. Schubert	Jena
Organmaterial v. Pferd	100	Untersuchung auf Chlamydien	Amtshilfe	13 x C. psittaci	E. Schubert	Jena
Organmaterial v. Schaf	9	Untersuchung auf Chlamydien	Amtshilfe	2 x Chlamydien	E. Schubert H. Hotzel	Jena
Tupfer v. Ziege	4	Untersuchung auf Chlamydien	Amtshilfe	1 x Chlamydien	H. Hotzel E. Schubert R. Bachmann	Jena
Zellkultur	14	Untersuchung auf Chlamydien	Amtshilfe	5 x Chlamydien 6 x C. psittaci	H. Hotzel E. Schubert	Jena

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Gewebe v. Maus	66	Untersuchung auf Chlamydien	Amtshilfe	1 x C. psittaci 1 x C. trachomatis	H. Hotzel R. Bachmann	Jena
Gewebe v. Hirsch	48	PCR-Untersuchung Chlamydien	Amtshilfe	1 x C. trachomatis 4 x C. psittaci 43 x negativ	E. Schubert R. Bachmann	Jena
Milch v. Rind	4	Kultur mit Immunfluoreszenz	Amtshilfe	4 x negativ	E. Schubert	Jena
Gewebe v. Meerschwein	2	Kultur mit Immunfluoreszenz	Amtshilfe	2 x negativ	E. Schubert	Jena
Gewebe v. Meerkatze	1	Kultur mit Immunfluoreszenz	Amtshilfe	1 x negativ	E. Schubert	Jena
Milch v. Ziege	4	Kultur mit Immunfluoreszenz	Amtshilfe	4 x negativ	E. Schubert	Jena
Zellkultur	1	Kultur mit Immunfluoreszenz	Amtshilfe	1 x negativ	E. Schubert	Jena
Gewebe v. Maus	4	Kultur mit Immunfluoreszenz	Amtshilfe	4 x negativ	E. Schubert	Jena
Gewebe v. Pute	2	Kultur mit Immunfluoreszenz	Amtshilfe	2 x negativ	E. Schubert	Jena
Sperma v. Schwein	4	Kultur mit Immunfluoreszenz	Amtshilfe	4 x negativ	E. Schubert	Jena
Gewebe v. Rind	4	Klärung Lungenseucheverdacht	Amtshilfe	4 x allg. Mykopl.-PCR positiv 4 x M. mycoides-PCR negativ 3 x M. bovis (kulturell) 1 x verunr. Kultur	E. Schubert M. Heller	Jena
Zellkultur	18	Kulturelle Untersuchung auf Mykoplasmen-Kontaminationen	Amtshilfe	10 x Anzucht negativ 6 x Mycoplasma spp. 2 x M. hyorhinis	E. Schubert	Jena
Zellkultur	19	PCR-Untersuchung Mykoplasmen-Kontaminationen	Amtshilfe	10 x PCR-positiv 9 x PCR-negativ	E. Schubert	Jena
Tupfer v. Schaf	3	Kulturelle Untersuchung auf Mykoplasmen	Amtshilfe	3 x negativ	E. Schubert	Jena
Tupfer v. Ziege	2	Kulturelle Untersuchung auf Mykoplasmen	Amtshilfe	2 x negativ	E. Schubert	Jena
Gewebe v. Maus	5	PCR-Untersuchung Mykoplasmen	Amtshilfe	5 x PCR-negativ	E. Schubert	Jena
Mykoplasmenkultur (Rind)	14	Stammdifferenzierung (IFT)	Amtshilfe	3 x M. bovis 3 x M. arginini 1 x M. bovigenitalium 2 x M. canadense 1 x M. californicum 4 x Mischkultur (M. bovis/M. arginini)	E. Schubert	Jena

Material	Menge	Zweck	Import, Export, hoheitlich	Diagnose	Personen	Standort
Mykoplasmenkultur (Huhn)	11	Stammdifferenzierung (IFT)	Amtshilfe	4 x M. gallinarum 3 x M. iners 3 x M. cloacale 1 x M. synoviae	E. Schubert	Jena
Mykoplasmenkultur (Schwein)	2	Stammdifferenzierung (IFT)	Amtshilfe	1 x M. hyosynoviae 1 x kein Wachstum	E. Schubert	Jena
Mykoplasmenkultur	2	Stammüberprüfung	Amtshilfe	1 x M. bovigenitalium negativ 1 x M. conjunctivae negativ	E. Schubert	Jena
Isolat v. Rind	25	Speziesdifferenzierung Mykoplasmen	Amtshilfe	2 x M. bovis (PCR)	H. Hotzel	Jena
Isolat v. Schwein	10	Speziesdifferenzierung Mykoplasmen	Amtshilfe	1 x M. hyosynoviae (PCR) 3 x M. hyorhinis (PCR)	H. Hotzel	Jena
Isolat v. Schaf	14	Speziesdifferenzierung Mykoplasmen	Amtshilfe	1 x M. conjunctivae (PCR)	H. Hotzel	Jena
Isolat v. Ziege	7	Speziesdifferenzierung Mykoplasmen	Amtshilfe	7 x PCR negativ	H. Hotzel	Jena
Isolat v. Vogel	16	Speziesdifferenzierung Mykoplasmen	Amtshilfe	16 x PCR negativ	H. Hotzel	Jena

10.3 Aufgaben im Rahmen des Gentechnikrechts

Meyers, G.*

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 Behördliche Aufgaben in epidemiologischen Arbeitsbereichen

Bewerbung, Planung und Durchführung eines EU Twinning-light-Projektes im Rahmen der Behördenpartnerschaften zwischen Slowenien und Deutschland, SI02/IB/AG/05/TL

Kramer, M.*, Staubach, C., Selhorst, T. und Pötzsch, C.

Die Europäische Union stellte im Zusammenhang mit ihrer Erweiterung finanzielle Mittel zur Verfügung, um im Rahmen von Behördenpartnerschaften zwischen Mitgliedsstaaten und Kandidatenländern die Angleichung der rechtlichen und institutionellen Rahmenbedingungen der Kandidatenländer an die EU Standards zu ermöglichen. Mit der Durchführung des Twinning-light-Projektes zwischen Slowenien und Deutschland unter Beteiligung von Österreich mit dem Thema „Monitoring Classical Swine Fever in Wild Boar“ wurde das Hauptziel verfolgt, ein Kontroll- und Surveillancesystem von Klassischer Schweinepest (KSP) in Slowenien zu etablieren. Mit dem Projekt sollte die Angleichung der Bekämpfungsmaßnahmen in Slowenien in Bezug auf KSP und ein effektives KSP-Monitoring bei Wildschweinen in Übereinstimmung mit EU-Empfehlungen implementiert werden.
Folgende Hauptaktivitäten wurden zur Erreichung des Projektzieles durchgeführt:

- Datensichtung, -sammlung von Streckenstatistiken oder anderen Census-Daten der Wildschweinepopulation von Slowenien, biometrische Bewertung und räumliche Analyse
- Erarbeitung eines Monitoring- und Surveillanceprogrammes für KSP in der Wildschweinepopulation in Slowenien
- Implementation des erstellten Programms (Sampling, Laboruntersuchung, Auswertung)
- Training von slowenischen Amtstierärzten und anderen Fachleuten (Studienreisen nach Deutschland).

Folgende Ergebnisse des Projektes lassen sich zusammenfassen:

- Etablierung eines landesweiten Überwachungsprogramms (Serologie) unter Verwendung eines dichte- und risikobasierten Ansatzes in Slowenien für mehrere Jahre (Untersuchungsumfang: 406 Seren pro Jahr)
- Untersuchungen aller klinischen Verdachtsfälle, Unfallwild und Fallwild in der Grenzregion zu Kroatien (virologisch und serologisch)
- Intensiviertes Überwachungsprogramm mit sich bewegenden Segmenten an der EU-Außengrenze, abhängig von der epidemiologischen Situation (Untersuchungsumfang: 500 - 600 Seren pro Jahr)
- Besondere Beachtung – Gebiete mit hoher Schweinedichte und Bestandsdichte, Kompostierungsanlagen, Wildschweinegatter etc.
- Training von elf slowenischen Veterinärbeamten/innen in Deutschland.

Twinning Projekt BG/2002/IB/AG/04 „Bulgarien TSE“
(Tieridentifikation und Nachverfolgbarkeit, Einschätzung der gegenwärtigen Situation und Verbesserungsvorschläge)
Teilnehmende Experten (FLI): Christoph Staubach, Carsten J. Pötzsch, Matthias Kramer, Andreas Micklich
Dauer: 9.-14.5.2004 und 23.-25.11.2004

Die Hauptziele der Missionen waren es, die Zusammenarbeit zwischen den für die TSE Überwachung und die Tieridentifikation verantwortlichen bulgarischen Einrichtungen zu verbessern sowie einen Erfahrungsaustausch auf dem Gebiet von Tierseuchenmeldesystemen zwischen der deutschen und der bulgarischen Seite zu beginnen. Im Rahmen des Projektes fanden in Bulgarien eine Mission von zwei deutschen Experten sowie ein Weiterbildungslehrgang statt. Außerdem besuchten bulgarische Experten deutsche Einrichtungen während zweier Studienbesuche. Folgende hauptsächliche Empfehlungen wurden ausgesprochen:
Mit der Anwendung des vorhandenen EUROVET-Systems kann Bulgarien die EU-Anforderungen bezüglich der Tieridentifikation und der Seuchenmeldungen erfüllen. Für die Anwendung dieses Systems, vor allem die Datenerhebung, bedarf es ausreichend und gut ausgebildeten Personals. Um EUROVET entsprechend seiner Möglichkeiten zu nutzen, ist die zeitnahe Eingabe der TSE-Diagnostikdaten notwendig. Das System bietet auch Geographische Informationssystem-Funktionalitäten; für deren Nutzung müssen jedoch die Tierhaltungsbetriebe georeferenziert sein. Gegenwärtig muss vor allem die Qualität der Primärtier- und Betriebsdaten verbessert werden. Für die Bereitstellung dieser Daten ist es notwendig, gesetzliche sowie organisatorische Rahmenbedingungen zu schaffen.

Arbeitsthema: Epidemiologische Einschätzung der Überwachung und Bekämpfung der Geflügelpest in China und der Mongolei
Pötzsch, C.
Dauer: 23.02. bis 31.03.2004
Auftraggeber: World Health Organization (WHO) über BMVEL

Das Hauptziel des WHO-Einsatzes in der Region war es, zur Minimierung des humanen Infektionsrisikos in den betroffenen Gebieten und zur Verhinderung einer Influenzapandemie beizutragen. Dazu sollten in dieser Mission die Geflügelpestsituationen in China und der Mongolei veterinärepidemiologisch bewertet und die Regierungen bei der Erarbeitung von Überwachungs- und Bekämpfungsplänen unterstützt werden.
Im Januar und Februar 2004 meldete China 49 Ausbrüche von Geflügelpest (GP) des Subtyps H5N1 in 16 der 32 Provinzen und administrativen Einheiten Chinas. Es konnte eingeschätzt werden, dass die GP-Ausbrüche in China nicht das Ergebnis eines einmaligen Viruseintrags in das Land waren. Es war vielmehr anzunehmen, dass GP-Viren schon längere Zeit vor den Ausbruchsmeldungen vorkamen. H5N1 sowie andere niedrig und möglicherweise auch hoch pathogene aviäre Influenzaviren existierten wahrscheinlich im Wassergeflügel und den Wildvögeln in der Region. Sie werden auch weiterhin entstehen, sich anpassen und rekombinieren. Die in den vergangenen Monaten immer wieder auftretenden Ausbrüche in vielen Ländern Südostasiens belegen, dass die GP nicht erfolgreich bekämpft wurde. Auch in Südostchina wurde am 6. Juli 2004 ein weiterer GP-Fall gemeldet. Zur Einschätzung der epidemiologischen Situation in China müssen systematische Untersuchungen in den verschiedenen Produktionssystemen und bei verschiedenen Geflügelarten, besonders dem Wassergeflügel, durchgeführt werden. Auch sollten auftretende Verluste abgeklärt sowie Lebendtiermärkte und Wildvögel überwacht werden. Ebenso ist ein langfristiges Bekämpfungsprogramm notwendig, das abhängig von der epidemiologischen Situation und

den Produktionssystemen die Vakzinierung und Keulung einschließt. Für diese Maßnahmen ist die Stärkung des Veterinärwesens vor allem auf kommunaler Ebene notwendig. Ein Großteil der gegebenen Empfehlungen fand sich zum Ende des Einsatzes in Plänen des chinesischen Landwirtschaftsministeriums wieder.
Mitte März gab es in der Mongolei Berichte über Verluste bei Wildvögeln. Die WHO beauftragte die Einschätzung einer möglichen GP-Gefährdung in der Mongolei. Insgesamt wurde das Infektionsrisiko mit GP-Viren für die mongolischen Geflügelbestände sowie für Menschen im Vergleich zu den Ländern mit GP-Ausbrüchen in der Region als niedrig eingeschätzt. Wenn Geflügelbestände betroffen wären, dann wäre die Seuche bei entsprechender Überwachung der wenigen Bestände schnell durch Keulung zu kontrollieren. Eine primäre Gefährdung von Menschen wäre vorwiegend auf solche mit intensivem Kontakt zu Geflügel oder Wildvögeln, sowie auf Labor- oder Medizinkräfte beschränkt. Die Diagnostik an den verendeten Vögeln ergab ein GP-negatives Ergebnis.
Die Arbeit der WHO fand seitens der Regierungen und der Öffentlichkeit Chinas und der Mongolei eine hohe Beachtung. Diese spiegelte sich besonders in Regierungsdokumenten und offiziellen Treffen sowie in den Medien wider.
Eine besondere Gefahr als Ausgangspunkt von Tierseuchen und Zoonosen stellen die ärmeren Länder in der Region dar. Diese Länder sind durch begrenzte Ressourcen in Veterinär- und Humanmedizin sowie durch hohe Bevölkerungs- und Tierdichten gekennzeichnet. Daher ist es unabdingbar, diese Länder bei der Krankheitsüberwachung und –bekämpfung durch internationale Organisationen sowie durch nationale Initiativen zu unterstützen. Nicht zuletzt können Länder durch die zunehmende Vernetzung nationaler und internationaler Krankheitsbekämpfungsstrukturen schneller und gezielter auf globale Gefahren durch Tierseuchen und Zoonosen reagieren.

Arbeitsthema: Bewertung der Maul- und Klauenseuche-Vakzination und der MKS-Überwachung in den Ländern des Transkaukasus (Georgien, Armenien, Aserbaidschan)
Pötzsch, C.

Dauer:	11.10. – 06.11.2004 u. 13.-17.12.2004
Auftraggeber:	Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) über BMVEL

Vorläufige Zusammenfassung:
Die beiden bisherigen Einsätze waren Teil eines Projektes, dessen Ziel die Einschätzung der MKS-Vakzination in den Grenzregionen der Transkaukasusländer mit der Türkei und Iran ist. Weiterhin sollen Lücken in der Impfdecke in der Pufferzone aufgedeckt und Maßnahmen zu deren Verminderung empfohlen werden. Serosurveillancestudien sollen vorgeschlagen werden, um das Auftreten von Nichtstrukturprotein (NSP)-positiven Proben im Jahr 2003 erklären zu können. Das Projekt wird voraussichtlich 2005 fortgesetzt. Das MKS-Impfprogramm wird von der EC finanziert und von der FAO implementiert.
Es konnte festgestellt werden, dass die in den Vakzinationskampagnen bereitgestellten Impfdosen wahrscheinlich auch eingesetzt werden. Nach Berichten der Länder wurden mit den EC/FAO-Impfdosen in der Pufferzone im Herbst 2004 ca. 100 % der Rinder Armeniens und Aserbaidschans und ca. 95 % der Rinder und kleinen Wiederkäuer Georgiens vakziniert. In den Jahren 2003 und 2004 wurden keine MKS-Fälle aus den Ländern berichtet. Berücksichtigt man jedoch die relativ ineffektive passive nationale Surveillance, bleibt die Verbreitung der MKS unklar. Schwierigkeiten gab es auch bei der Aufrechterhaltung der Kühlketten für Impfstoffe, besonders im ländlichen Bereich in Georgien und Aserbaidschan. Insgesamt waren die Ressourcen der Veterinärdienste der Länder äußerst begrenzt; eine Situation, die auch die Überwachung und Bekämpfung der MKS negativ beeinflusste. Lücken in der Impfdecke in der

Pufferzone wurden möglicherweise durch große Populationen nicht oder ungenügend vakzinierter Schafe und Jungtiere verursacht, wobei besonders Schafe lange Wege zu den Saisonweiden zurücklegen. Eine geographische Lücke in der Pufferzone besteht möglicherweise zwischen Berg Karabach und dem Iran. Die Pufferzone wird auch durch den offiziellen und den informellen nationalen und internationalen Handel mit Tieren und tierischen Produkten umgangen. Insgesamt bietet eine ca. 10-60 km breite Impfzone keinen ausreichenden Schutz vor einem Viruseintrag, es muss das gesamte Territorium der Länder in die Bekämpfungsstrategien einbezogen werden.
Zwei Serosurveillance-Pilotstudien wurden ausgearbeitet und Georgien und Aserbaidschan zur Durchführung in der Pufferzone vorgeschlagen. Mit den Ergebnissen dieser Studien könnte das Auftreten von NSP-positiven Proben im Jahr 2003 besser erklärt werden.
Um zu einer stärker risikobasierten Impf- und Überwachungsstrategie in den Transkaukasusländern überzugehen, müssen die epidemiologischen Fachkenntnisse, die diagnostischen Voraussetzungen sowie die Zusammenarbeit mit benachbarten Ländern und internationalen Organisationen deutlich verbessert werden.
Im Jahr 2005 werden die Auswertung der Pilotstudien in Georgien und Aserbaidschan, das Erstellen von Serosurveillanceplänen in allen drei Ländern und die Nachverfolgung der Lücken in der Impfdecke der Pufferzone sowie Maßnahmen zu deren Verminderung im Vordergrund stehen.

10.5 Abgabe von Diagnostika

Virusstämme:
(Bovines) Rotavirus A (RV-A)
Border Disease Virus (Schaf) (BDV)
Bovines Coronavirus (BCV)
Bovines Enterovirus (BEV)
Bovines Herpesvirus 1 (BoHV-1)
Bovines Herpesvirus 2 (BoHV-2)
Bovines Parainfluenza-3-Virus (BPIV-3)
Bovines Virusdiarrhoe Virus Typ 1 und 2 (BVDV)
Canines Coronavirus (CCV)
Canines Parvovirus (CPV)
Caprines Herpesvirus (CpHV)
Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV)
Equides Herpesvirus 1 (EHV-1)
Equides Herpesvirus 2 (EHV-2)
Equides Herpesvirus 4 (EHV-4)
Equines Influenzavirus A/Equine 1/Prague/1/56 (H7N7)
Equines Influenzavirus A/Equine 2/Miami/1/63 (H3N8)
Felines Calicivirus (FCV)
Felines Coronavirus (FIPV)
Koi-Herpesvirus (KHV)
Porzines Teschovirus 3 (PTV-3)
Porzines Teschovirus 5 (PTV-5)
PRRS-Virus (PRRSV)
Virus der Bovinen Virusdiarrhoe 1 (BVDV-1)
Virus der Bovinen Virusdiarrhoe 2 (BVDV-2)
Virus der Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVCV)
Virus der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV)

Virus der Infektiösen Hämatopoetischen Nekrose (IHNV)
Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV), Serotypen SP, AB und VR299
Virus der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV)
Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV)
White Bream Virus (WBV, „Güster-Virus“)

Bakterienstämme:
Mykobakterienstämme:
Mycoplasma bovis
Mycoplasma hyopneumoniae
Mycoplasma bovigenitalium

Chlamydophila abortus
Chlamydophila felis

Pasteurella multocida

Chromosomale DNA folgender Spezies:
Chlamydia suis
Chlamydophila abortus
Chlamydophila pecorum
Chlamydophila psittaci
Chlamydophila pneumoniae
Mykobakterien
Campylobacter

Antiseren:
BVDV-Hyperimmunserum
BHV-1 Hyperimmunserum
BoHV-2-Hyperimmunserum
Haemophilus parasuis-Hyperimmunseren *(SV 1-15)*
positives Referenzserum für Lungenseuche-KBR
negatives Referenzserum für Lungenseuche-KBR
Referenzseren zur Brucellose-Diagnostik (KBR, SLA)
Referenzseren zur serologischen *Brucella-canis*-Diagnostik (KBR, SLA)
Referenzseren zur serologischen *Brucella-ovis*-Diagnostik (KBR)
positives Referenzserum für *Trypanosoma-equiperdum*-Diagnostik (KBR)
negatives Referenzserum für *Trypanosoma-equiperdum*-Diagnostik (KBR)
Referenzseren zur BHV gE-Antikörperdiagnostik
Referenzseren und Referenzmilchproben zur BLV-Antikörperdiagnostik
Referenzproben für die Tollwutdiagnostik
BLV-Referenzseren, positiv für AGIDT und ELISA
BLV-Referenzseren, schwach positiv für ELISA
BLV-Referenzseren, negativ für AGIDT und ELISA
BLV-Referenzseren, falsch positiv für ELISA
CAEV-Referenzseren, positiv für ELISA
CAEV-Referenzseren, negativ für ELISA
KHV-Hyperimmunserum
WBV-Hyperimmunserum

Antigene:
Antigen für Lungenseuche-KBR
Brucella-ovis-Antigen (KBR, SLA)
Trypanosoma equiperdum

Nukleinsäurepräparationen:
Koi-Herpesvirus (KHV)-RNA
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-BHV-1 (anti-gB, anti-gE)
Anti-ILT-Virus-MAK-25-5 (gJ)
Anti-ILT-Virus-MAK 28-5 (gC)
Anti-ISAV (ISA/6E6, ISA/18B11)
Anti-KHV (KHV/10°9)
Anti-*Mycoplasma bovis*
Anti-PTV (040/4B1)

Parasiten:
Trypanosoma equiperdum

Zellkulturen:
Permanente fremdvirusfreie Zelllinie BLV PO714 zur Produktion von BLV

Anderes:
Referenzmilch zur Brucellose-Diagnostik (Milch-ELISA)
BLV-Referenzmilch, positiv für ELISA
BLV-Referenzmilch, negativ für ELISA

10.6 Organisierte Tagungen und Kurse

Baumbauer, R., Schlüter, H., Kramer, M.: The East of Turkey as a key for the FMD control strategy in Turkey. – FMD Symposium in the framework of the 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, 22.09.2004, Kars, Türkei

Beier, D.: Meeting of the O.I.E. Reference Laboratories for Bovine Enzootic Leucosis in Europe, 11.-13.10.2004, Wusterhausen

Cameron, A., Roeder, P., Pötzsch, C.J., Sammin, D.: Regional Animal Health Workshop on surveillance strategies for transboundary animal diseases, 13.-17.12.2004, Tbilisi, Georgien

Fichtner, D., Bergmann, S.M., Enzmann, P.-J., Fischer, U., Köllner, B. und Kotterba, G.: X. Gemeinschaftstagung der Deutschen, der Österreichischen und der Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP) zum Thema Fischkrankheiten, 8.-10.09.2004, Stralsund

Heller, M.: Sitzung der Arbeitsgruppe „Lungenseuche“ zur Fortentwicklung des Tierseuchenbekämpfungshandbuchs im Rahmen der Task Force Tierseuchenbekämpfung, 27.10.2004, Jena

Hotzel, H.: Tagung der Arbeitsgruppe „Molekulare Diagnostik“ des AVID, 23.06.2004, Jena

Klöß, D., Kroschewski, K. und Schröder, R.: 14 TSN-Anwenderschulungen für Einsteiger und Fortgeschrittene im Zeitraum Mai bis Dezember 2004 (9 intern im FLI, 5 extern durchgeführt)

Kramer, M., Staubach, C., Selhorst, T.: Workshop on Monitoring of Classical Swine Fever in Wild Boar in Slovenia, TWINNING LIGHT PROJECT between SLOVENIA and GERMANY, SI02/IB/AG/05/TL, 30.03.2004, Cerkno, Slowenien

Kramer, M., Teuffert, J. Staubach, C., Teske, K.: Organisation und Durchführung von Durchgängen einer fallbezogenen Gruppenübung des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft zur Bekämpfung eines angenommenen MKS-Ausbruchs gemäß Bundesmaßnahmenkatalog Tierseuchen, 12.-16.01.2004, AKNZ Ahrweiler

Micklich, A., Kroschewski, K.: Durchführung von 12 Schulungen zum EDV-Projekt TRACES mit ca. 300 Teilnehmern

Reinhold, P.: 6.Workshop des Arbeitskreises “Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems” der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 10.-11.03.2004, Frankfurt/M.

Sachse, K.: 2nd Workshop of COST 855 “Animal Chlamydioses and the Zoonotic Implications”, 01.-02.09.2004, Budapest

Schulze, F., Hänel, I.: 23. Jenaer Symposium Campylobacter-Infektionen, 01.-02.07.2004, Jena

Ziller, M.: Invited Session Risk Assessment bei der International Conference on Statistics in Health Sciences, 23.-25.06.2004, Nantes, Frankreich

10.7 Referenzlaboratorien

Referenzlabor für Orbivirusdiagnostik
(M. Büttner)

Das Referenzlabor für Orbivirusdiagnostik überwacht im Rahmen der hoheitlichen Aufgaben für das BMVEL 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 Experten-vergleichstests der EU teil und erfüllt die Anforderungen des Qualitätsmanagements.
Für die Kontrolle potenziell 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 Kontaminations-diagnostik 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 wird. 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 und Todesfälle insbesondere bei Ferkeln b) die histologische Untersuchung bestätigt das Vorliegen einer nicht eitrigen Polioenzephalomyelitis, c) differenzialdiagnostisch ist Schweinepest ausgeschlossen und d) Teschovirus wurde isoliert und identifiziert. Auf Grund der notwendigen komplexen Betrachtungsweise beschränken sich die Leistungen des Referenzlabors auf die Verifizierung des Virusnachweises und soweit möglich und erforderlich auf eine Serotypisierung. Monoklonale Antikörper zum In-vitro-Nachweis von porzinen Teschoviren mittels Immunfluoreszenz stehen zur Verfügung und werden im Bedarfsfall an Untersuchungseinrichtungen abgegeben.
In Einzelfällen wurde an das Referenzlabor der Wunsch herangetragen, die Freiheit von Ansteckender Schweinelähmung in einem Tierbestand zu befunden. Hierzu wurden Serumpaare hinsichtlich ihres Antikörpertiters gegen einen PTV-1-Stamm untersucht sowie RT-PCR-Tests durchgeführt. Liegt kein akuter Hinweis auf ein Krankheitsgeschehen im Bestand vor, ist die Aussagekraft derartiger Untersuchungen wegen der großen Verbreitung und Typenvielfalt von Teschoviren jedoch als gering einzuschätzen. Eine Zertifizierung „frei von Teschener Krankheit“ kann u.E. nur an Hand klinischer Daten vorgenommen werden.
Das Referenzlabor verfügt für Dokumentations- und Vergleichszwecke über eine Sammlung von mehr als 250 PTV-Referenz- und Feldvirusstämmen und ist an deren laufender Ergänzung 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 Potenzial zur Auslösung der Teschen-Talfan-Krankheit besitzen.

Nationales Referenzlabor für die Aujeszkysche Krankheit
(Th. Müller)

Mit der Entscheidung 2003/103/EEC der Kommission ist die Bundesrepublik Deutschland offiziell als frei von Aujeszkyscher Krankheit (AK) anerkannt. Durch das NRL für Aujeszkysche Krankheit wurden seither Vorschläge für einen stufenweisen Stichprobenplan hinsichtlich der Überwachungsuntersuchungen zur Aufrechterhaltung eines AK-freien Status in den Ländern gemacht. Zukünftig wird ein zweistufiger Stichprobenplan Anwendung finden, d. h. anstelle der Untersuchung aller Schweinehaltungsbetriebe werden eine Stichprobe von Schweinezucht- und -mastbeständen und darin Schweine nach dem Stichprobenschlüssel entsprechend AK-Verordnung (Abschnitt II) untersucht. Diese Vorgehensweise erlaubt eine erhebliche Reduzierung des Untersuchungsaufwandes bei gleichzeitiger Gewährleistung der statistischen Aussagekraft.
Die Aufgaben des nationalen Referenzlabors für Aujeszky’sche Krankheit (AK) umfassen drei wesentliche Schwerpunkte, wie (i) die Labordiagnostik (Bestätigung von Diagnosen sowie Abklärung von AK-Verdachtsfällen, Sammlung, Erhaltung und Charakterisierung von PrV-Virusstämmen), (ii) die Standardisierung der Diagnostik (Vergleich von Testverfahren und Testreagenzien, Abgabe von Referenzseren, -virusstämmen, Aktualisierung von diagnostischen

Methoden, Durchführung von Ringversuchen) sowie (iii) hoheitliche Aufgaben (Erarbeitung von Grundlagen für Leitungsentscheidungen, Stellungnahmen zu Entwürfen, Änderungen oder Neufassungen von nationalen, WHO- bzw. OIE- Richtlinien).

Nationales Referenzlabor für Beschälseuche der Einhufer
(I. Moser)

Die Beschälseuche (Dourine) der Einhufer ist eine venerische Infektionskrankheit, die durch den einzelligen Parasiten *Trypanosoma equiperdum* hervorgerufen und allein beim Deckakt übertragen wird. In Deutschland gehört sie zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen und ist seit vielen Jahren getilgt, während sie in vielen Ländern der Erde, z. B. in der Mongolei und vielen anderen Ländern östlich und südlich von Europa heute noch vorkommt. Deshalb besteht stets die Gefahr, den Erreger durch Importtiere aus Risikogebieten erneut einzuschleppen. Die Diagnostik der Erkrankung birgt Schwierigkeiten, da der Erregernachweis aufgrund des spezifischen Krankheitsverlaufes in der Regel nicht erfolgreich geführt werden kann. Aus diesem Grund wird die Infektion durch den Nachweis von spezifischen Antikörpern diagnostiziert. Die Methode der Wahl ist nach wie vor die Komplementbindungsreaktion (KBR). Der ELISA wurde von der OIE ebenfalls als Nachweismethode anerkannt, ist in der Regel sensitiver aber nicht spezifischer als die KBR. Im NRL wird die KBR als Nachweismethode angewandt.
Im Jahre 2004 wurden insgesamt 18 Blutserumproben in Form von Bestätigungsuntersuchungen auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper untersucht. In fünf Fällen wurden in den Verdachtsproben keine Antikörper nachgewiesen, in dreizehn Proben konnten Antikörper in geringer Konzentration (> 1:5) nachgewiesen werden. Bei drei dieser Serumproben wurde ein Antikörpertiter von 1:10/20 gefunden. Dies sind Grenztiter, die nach Entscheidung der OIE bzw. der EU gerade als positiv zu bewerten sind. Klinische Erscheinungen waren bei keinem der Pferde diagnostiziert worden. In einem Fall wurde der Versuch des direkten Erregernachweises durchgeführt, jedoch ohne Erfolg.
Neben der Durchführung diagnostischer Untersuchungen stellte das Referenzlabor das für die KBR benötigte, in Deutschland einzig zugelassene Antigen her, welches kostenfrei an die Landesuntersuchungsämter abgegeben wird.
Auch Untersuchungslabors im europäischen Ausland wurden auf Anfrage beliefert.
Weiterhin wurde das Referenzlabor von den entsprechenden Partnereinrichtungen in Litauen, Polen und der Türkei um „Amtshilfe“ bei der Bestätigung von Verdachtsdiagnosen gebeten, so dass drei „Ringversuche“ durchgeführt wurden.
Im Rahmen des Twinning-Projektes TR02/IB/AG-01 war eine Wissenschaftlerin aus der Türkei für vierzehn Tage zu Gast am NRL für Beschälseuche, um ein Methodentraining für weiterführende Diagnostikmethoden zu absolvieren.

Nationales Referenzlabor für Bovine Herpesviren Typ 1 (BHV-1)
(M. Beer)

Ein wesentlicher Bestandteil der BHV-1-Bekämpfung in Deutschland ist seit der Verabschiedung der BHV-1-Verordnung 1997 die Vakzinierung mit gE-Deletionsvakzinen und die gezielte Differenzierung von geimpften und Feldvirus-infizierten Rindern durch den Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern (Markerdiagnostik). Die Impfung mit Markervakzinen soll weiterhin Feldvirus aus den verseuchten Regionen und Beständen verdrängen, ohne die Diagnostik zu beeinträchtigen. Doch eben diese Kombination aus Markervakzine und -diagnostik eröffnete ein neues Problemfeld für die BHV-1-Serologie. Um die Bekämpfung

weiter voranzutreiben, trat am 10.11.2004 die erste Verordnung zur Änderung der BHV-1-Verordnung in Kraft und 2004 wurde zudem das deutsche BHV-1-Bekämpfungsprogramm gemäß Artikel 9 der Richtlinie 64/432/EWG von der EU anerkannt. Erstmals wurde dabei die Unterscheidung der Untersuchungsverfahren für markergeimpfte und ungeimpfte Rinder strikt vorgenommen: markergeimpfte Tiere werden auf gE-Antikörper untersucht, während ungeimpfte Tiere auf BHV-1-Antikörper mit konventionellen Testsystemen geprüft werden. Im NRL für BHV-1 wurden daher besonders Einsendungen zur Klärung von unklaren Befunden in der nun durchgehend zweigeteilten BHV-1-Serologie bearbeitet.
Aufgrund der verpflichtenden Untersuchung auf BHV-1- bzw. BHV-1-gE- Antikörper hat sich das Probenaufkommen auch 2004 wieder deutlich erhöht. Im Jahr 2004 wurden 1.964 Serum- und Plasmaproben sowie 33 Milchproben aus 124 Einsendungen aufgrund unklarer Befunde 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 zehn 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. Die PCR-Diagnostik im NRL wurde dabei um ein Real-time-PCR-System erweitert, das sowohl BHV-1-gD-spezifische Sequenzen als auch gE-spezifische Genomabschnitte sehr sensitiv und spezifisch detektiert. In 39 Fällen wurde zudem eine Charakterisierung von Virusisolaten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, der PCR, des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus oder der Sequenzierung von Genomabschnitten durchgeführt.
Die gE-Antikörper-Diagnostik wurde 2004 um einen Prototyp ELISA erweitert, der gE-Antikörper detektiert, die gegen ein Epitop gerichtet sind, das sich von dem in den kommerziellen Testsystemen geprüften unterscheidet. Der in diesem ELISA verwendete Antikörper 4D7 bindet gI-unabhängig an gE. Erste Untersuchungen von Seren so genannter „Pseudoimpflinge“ (BHV-1-Antikörper-positiv und BHV-1-gE-Antikörper-negativ, jedoch keine Markerimpfung) zeigten, dass bisher keine auffälligen Reaktivitäten nachgewiesen werden konnten, die beispielsweise auf das Auftreten von gE-Mutanten hinweisen, die in der Lage sind, sich den kommerziellen Testsystemen zu entziehen. Bisher konnte nur eine Labormutante beschrieben werden (BHV-1- AUS12), die durch eine Mutation im gE keine mit den gängigen gE-Systemen nachweisbaren Antikörper induziert. AUS12-spezifische gE-Antikörper können aber sicher mit dem neuen 4D7-gE-Antikörper-System detektiert werden.
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 Referenzmilchproben (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. Die Weitergabe von einigen gE-Standardseren an amtliche Untersuchungsstellen erfolgte auch weiterhin durch das FLI Wusterhausen.
Im Rahmen der Zulassung und Chargenfreigabe von *In-vitro*-Diagnostika wurden insgesamt 36 verschiedene Testchargen (BHV-1 und BVD) geprüft. In einem Fall wurde die Chargen-Freigabe für einen BHV-1-ELISA nicht empfohlen.
Erstmals wurden im Jahr 2004 Tiere mit fraglichen gE-Ergebnissen aus ansonsten gE-Antikörper-negativen Betrieben in einem Reaktivierungsexperiment untersucht. Nach der Applikation hoher Dosen Dexamethason konnte allerdings bei keinem der Tiere BHV-1-Virus isoliert werden. Auch eine signifikante Steigerung der Antikörpertiter in Folge der Dexamethason-Behandlung war nicht nachzuweisen. Die Rolle solcher Tiere bleibt daher

weiterhin unklar und insbesondere in Gebieten mit gE-Antikörper-freien Impfbeständen ist eine genaue Beobachtung im Falle eines „Impfausstieges“ notwendig.

Nationales Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease
(M. Beer [bis 29.10.04], H. Schirrmeier)

Die Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD) gehört zu den weltweit wirtschaftlich bedeutsamsten Infektionserkrankungen beim Rind. In zahlreichen Ländern werden mittlerweile Programme zur Eradikation der BVD/MD durchgeführt. Auch in Deutschland gibt es länderspezifische Bekämpfungsprogramme. Seit dem 03.11.2004 ist die BVD/MD in Deutschland anzeigepflichtig, eine Bundesverordnung befindet sich in der Diskussion. Mit der Einrichtung eines NRL für BDV/MD durch Erlass des BMVEL am 15.07.2004 wurde am FLI ein Ansprechpartner für Behörden des Bundes und der Länder, insbesondere in Fragen der Diagnostik, geschaffen. Bereits vor diesem Zeitpunkt war ein beauftragtes Labor für die erforderlichen Prüfungen im Rahmen von Zulassungen und Chargenprüfungen tätig. Eine Untersuchungspflicht für alle Zucht- und Nutzrinder ist im Rahmen einer BVD-Bundesverordnung geplant. In einer Anlage zu dieser Verordung werden Untersuchungsmethoden und Probenschemata für virologische und serologische Untersuchungen, abgestimmt auf Untersuchungszweck, Tieralter und festzulegende Falldefinitionen, vorgegeben. Den neuen Anforderungen an die bundeseinheitliche Diagnostik versucht das NRL mit nachstehendem Leistungsangebot gerecht zu werden:

- Antigen-, Genom- und Antikörpernachweise zur Abklärung unklarer Ergebnisse,
- Charakterisierung von Virusisolaten,
- Bereitstellung von Referenzmaterialien (Virus, Seren, Zelllinien),
- Überprüfung, Standardisierung und Weiterentwicklung von Testverfahren,
- Durchführung von Qualifizierungsmaßnahmen z.B. für Mitarbeiter der Untersuchungsämter,
- Durchführung nationaler Ringvergleichstests,
- Zulassungsuntersuchungen und Chargenprüfungen,
- Teilnahme an EU-Ringtests,
- Beteiligung an Arbeitsgruppen und Forschungsprojekten der Europäischen Union,
- Forschungsarbeiten zur BVD.

Die im NRL für BVD/MD angewendeten Standard-Diagnostikverfahren werden in die aktualisierte Fassung „Arbeitsanleitungen zur Diagnose anzeigepflichtiger Tierseuchen“ (Herausgeber: BMVEL, zukünftig FLI) aufgenommen.

OIE- und nationales Referenzlaboratorium für Enzootische Rinderleukose (ERL)
(D. Beier)

Das nationale und OIE-Referenzlabor für ERL nimmt hoheitliche Aufgaben sowohl bei der Diagnostik und Bekämpfung als auch bei der Klärung epidemiologische Fragestellungen wahr. Es wurden im Berichtszeitraum insgesamt 496 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 bzw. wurden international als vergleichende Untersuchungen

zwischen Kooperationspartnern (collaborating centres, reference laboratories) durchgeführt. Zur Typisierung wurden alle positiven BLV-Provirus-*env*-Amplifikate einer RFLPA unterzogen und teilweise sequenziert. Referenzproben (Blutserum und Milch) als Lyophilisate mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen sowie BLV-Provirus DNA wurden nach Anforderung nationalen und internationalen Untersuchungseinrichtungen zur Verfügung gestellt (Frankreich, Niederlande, Ukraine, Österreich, Bulgarien, England, Schweden). Eine neue permanent BLV produzierende Zelllinie (PO 714) wurde einem weiteren ELISA-Testkithersteller (Fa. Inst. Pourquier, Frankreich) zur Prüfung als kontaminationsfreier Antigenproduzent überlassen. Ringtests zur Evaluierung der Antikörper-Diagnostik erfolgten mit Probenmaterial aus Weybridge und Wusterhausen.
In der Zeit vom 11.-13.10.2004 wurde in Wusterhausen ein Meeting zwischen den OIE Referenzlabors aus Uppsala, Schweden, (Dr. Lena Renstroem), Weybridge, UK (Dr. Christopher Venables) unter Teilnahme von Wissenschaftlern des FLI Insel Riems und der FU Berlin durchgeführt. Die Schwerpunkte der Vereinbarungen und Diskussionen betrafen die Herstellung eines neuen BLV-Antikörper-positiven EU Standardserums unter Berücksichtigung der BLV-Subtypen in der nächsten Zeit; die Herstellung einer BLV-Antikörper-positiven EU Standardmilchprobe unter Berücksichtigung der BLV-Subtypen, die Harmonisierung der PCR-Diagnostik sowie die Intensivierung der wissenschaftlichen Zusammenarbeit (auf der Basis der Zusammenarbeit nach den Ausführungen des 6. EU-Rahmenprogrammes). Die internationale Kooperation zwischen den OIE-Referenzlabors konnte somit weiter intensiviert werden.

Nationales Referenzlabor für aviäre Influenza
(O. Werner)

Die Geflügelpestausbrüche in Südostasien und die umfangreichen Überwachungsuntersuchungen in Deutschland prägten im Jahr 2004 die Tätigkeiten im Referenzlabor für AI. Zunächst mussten Materialien wie Geflügelfleisch und Zubereitungen, die noch vor der Kommissionsentscheidung 2004/84/EG aus Thailand importiert worden sind, auf das Freisein von AIV getestet werden. Auch zwei Desinfektionsmittel wurden auf Wirksamkeit gegen hoch pathogenes (HP) AIV geprüft. Da in Asien die Geflügelpest zu Erkrankungen bei Menschen führte, wurde die Zusammenarbeit mit Einrichtungen der Humanmedizin intensiviert. Den humanmedizinischen Referenzlabors für Influenza wurden das Protokoll der H5-HA-PCR und H5-Kontrollmaterial sowie Virusstämme und Seren von elf anderen AIV-Subtypen zur Verfügung gestellt. Wegen des Gefährdungspotenzials für Menschen wurde im FLI im L4vet-Bereich die Möglichkeit geschaffen, mit dem HPAIV H5N1 aus Asien zu arbeiten.
In Deutschland wurden auf der Basis der Entscheidung 2004/111/EG die Überwachungsuntersuchungen bei Wildvögeln und Geflügel weitergeführt. Mehr als 6.000 Seren von Hühnern, Puten, Enten und Gänsen wurden auf Antikörper gegen AIV H5 und H7 geprüft und dabei zwei positive Gänsebestände ermittelt. Versuche zur Virusisolierung in den Beständen sowie virologische und serologische Untersuchungen in der Umgebung verliefen negativ.
Zwei AIV-Isolate aus importierten Finkenvögeln konnten serologisch und mittels PCR als H3N8 subtypisiert werden.
Ein nationaler Ringtest, der sowohl PCR als auch Virusisolierung beinhalten soll, wurde in Vorversuchen vorbereitet und soll im Januar 2005 verschickt werden. Das Referenzlabor selbst hat wieder erfolgreich am EU-Ringtest zur Diagnostik der Newcastle Disease und der aviären Influenza teilgenommen.
Zur Unterstützung der Diagnostik in den neuen EU-Mitgliedsländern und in Drittländern wurden Referenzantigene und Seren für die Subtypisierung an Einrichtungen in der Slowakei, der Türkei und dem Iran abgegeben und Mitarbeiter methodisch eingearbeitet. Außerdem wird die Funktion des Referenzlabors für Polen wahrgenommen.

Im Rahmen der Beratungstätigkeit für das BMVEL 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 Hämatopoetische Nekrose (IHN), zwei Krankheiten der Liste II der Aquakultur-Richtlinie der EU, sowie die Infektiöse Anämie der Lachse (ISA), die in die Liste I eingeordnet wurde und in Deutschland bisher nicht aufgetreten ist.
2004 wurden sechs Organhomogenate bzw. Virusisolate von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss)* an das NRL-F zur Virusisolierung oder -identifizierung eingesandt. Bei den isolierten Viren handelte es sich um VHSV. Ergänzend zu den zugelassenen Nachweismethoden wurde zur Bestätigung der Befunde die RT-PCR eingesetzt. Der Verdacht auf Sleeping Disease (SD) konnte bei zwei Einsendungen nicht bestätigt werden.
Bei besonderen epizootiologischen Fragestellungen erfolgte entsprechend der EU-Richtlinie 93/53 (EWG) die genetische Analyse von Virusisolaten durch Sequenzierung ausgewählter Genombereiche. Durch Analyse von neun VHSV-Isolaten konnte die Ursache des Ausbruchs bzw. die Herkunft des Virusstammes aufgeklärt werden. In die Untersuchungen zur Einordnung der Europäischen IHNV-Isolate in den genetischen Stammbaum wurden sechs Isolate aus der Schweiz einbezogen.
Vom Europäischen Wels (*Silurus glanis*) wurde erneut ein Iridovirus isoliert, das als European Sheatfish Virus (ESV) bezeichnet wird und eng verwandt mit dem Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV) ist. Die Methoden zum Nachweis dieser Iridoviren wurden am NRL-F etabliert.
Mehrere Ansätze importierte Eier vom Lachs *(Salmo salar)* wurden auf Freisein von ISA-Virus getestet. Die erbrüteten Lachse sollten zum Besatz von Wildgewässern verwendet werden.
Das Koi-Herpesvirus (KHV) verursachte auch 2004 verlustreiche Krankheitsgeschehen bei Kulturkarpfen (*Cyprinus carpio carpio*) und beim Koi (*Cyprinus carpio koi*). Die PCR wurde optimiert und erwies sich als geeignete Methode zum Nachweis des KHV. In fünf von sechs Einsendungen von Nutzkarpfen und in vier Einsendungen von Koi-Karpfen konnte KHV-Genom nachgewiesen werden. Aus wissenschaftlichem Interesse und in Amtshilfe wurden auch Proben aus Polen, Südafrika und Indonesien auf KHV untersucht. Als Diagnostika zum Nachweis von KHV in Zellkulturen und in Organschnitten wurden ein Antiserum vom Kaninchen und monoklonale Antikörper (mAk) hergestellt und für die Untersuchungsämter zur Verfügung gestellt.
Aus Aalen *(Anguilla anguilla)* wurden wieder das Herpesvirus anguillae (HVA), Erreger der sogenannten „Rotkopfkrankheit“, das Eel Virus European X (EVEX) und Reoviren isoliert und identifiziert.
Zier- und verschiedene Wildfische wurden auf Virusinfektionen untersucht. Bei Fischen aus dem „Bachforellen *(Salmo trutta trutta)* -Sterben in Bayern“ konnte kein Virus isoliert werden. Im Rahmen der Risikoabschätzung beim Import von Zierfischen war die Untersuchung von sieben verschiedenen Spezies auf EHNV-Genom ebenfalls negativ.

Gegenwärtig sind 25 Zelllinien an der „Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin“ verfügbar.
MAk gegen KHV und ISAV wurden weiter charakterisiert und stehen für Forschung und Diagnostik zur Verfügung.
Das NRL-F nahm erfolgreich am jährlich stattfindenden Ringvergleich der nationalen Referenzlaboratorien der Mitgliedsländer der EU teil, der vom Gemeinschaftlichen Referenzlabor in Aarhus, Dänemark, durchgeführt wurde.
Beim jährlichen Treffen der Vertreter der Nationalen Referenzlaboratorien für Fischkrankheiten aus den Mitgliedsländern der EU wurde eine Analyse über Umfang und Struktur der Aquakultur, über Daten zur Epizootiologie, Diagnose und Bekämpfung der VHS und IHN sowie über Umfang und Ergebnisse der Laboruntersuchungen zu virusbedingten Fischkrankheiten in Deutschland vorgelegt.

Nationales Referenzlabor für klassische Schweinepest
(K.R. Depner)

Die Aufgaben des Referenzlabors für klassische Schweinepest (CSF) leiten sich aus dem Aufgabenkatalog des EU-Referenzlabors für CSF (Richtlinie 2001/98EU) sowie aus dem Tierseuchengesetz ab.

Diagnostik
Klassische Schweinepest bei Hausschweinen ist 2004 nicht aufgetreten. Bei Wildschweinen wurde die Seuche in Rheinland-Pfalz diagnostiziert.

Einen Überblick über die diagnostische Arbeit am Referenzlabor gibt folgende Auflistung:

Anzahl Einsendungen	6
Anzahl Erregernachweise	2
Anzahl Antikörpernachweise	21

Referenzaufgaben
Zur Optimierung und Standardisierung der CSF-Diagnostik wurde im Rahmen des alljährlichen Ringtests standardisiertes Untersuchungsmaterial an alle Untersuchungs-einrichtungen, die in Deutschland CSF-Diagnostik betreiben, versandt. Der Ringtest ist in erster Linie als Hilfe zur Eigenkontrolle der eingesetzten Testverfahren gedacht. Indirekt trägt er auch zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Laboratorien bei.
Die Untersuchungseinrichtungen wurden mit dem Verschicken zahlreicher Referenzmaterialien (Virusstämme, Zellkulturen, Referenzseren) unterstützt. Die Materialien dienten hauptsächlich zur Etablierung von Testmethoden für die CSF-Diagnostik und Differenzialdiagnostik.

Chargenfreigabe von Diagnostika und Impfstoffen
Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Chargenprüfungen von CSF-Diagnostika und Impfstoffen.

Chargenfreigabe Antikörper-ELISA	9
Chargenfreigabe Antigen-ELISA	7
Chargenfreigabe CSF-Konjugat	1
Chargenfreigabe CSF-Vakzine	3

Nationales Referenzlabor für die Lungenseuche der Rinder
(M. Heller)

Die weltweite epidemiologische Situation bei der Lungenseuche der Rinder blieb 2004 im Vergleich zu den Vorjahren weitestgehend unverändert. Die letzten Fälle in Europa traten 1993 in Italien und 1999 in Portugal auf.
Im Berichtszeitraum wurde Organmaterial einer verendeten Kuh, bei der im Zusammenhang mit weiteren verendeten Tieren sowie Tieren mit massiven respiratorischen Symptomen Verdacht auf Lungenseuche bestand, per Kurier zur Untersuchung zugestellt.
Die verendeten Kühe zeigten bei der Sektion eine hochgradige akute Pleuropneumonie und Perikarditis. In der Trachea und subepicardial fanden sich petechiale Blutungen. Klinisch standen trockener Husten, muköser Nasenausfluss, Schwanken und Rektaltemperaturen über 40°C im Vordergrund. Alle betroffenen Tiere stammten aus einer Gruppe von 33 Importkühen (Italien), von denen acht Tiere innerhalb von fünf Tagen nach dem Transport verendeten.
Bei den in Jena eingegangenen Proben handelte es sich um Lungengewebe, Trachea und Körperflüssigkeit. Eine Blutprobe stand nicht mehr zur Verfügung. Zuvor waren Proben des Tieres bereits im Veterinäruntersuchungsamt in Frankfurt/Oder mittels einer PCR untersucht worden. Bei dieser PCR handelt es sich um ein Verfahren, mit dem alle Mykoplasmen-Spezies nachgewiesen werden können. Die PCR besitzt also keine Spezifität für den Lungenseuche-Erreger. Dieser PCR-Test fiel bei allen Proben positiv aus, was den Verdacht auf Lungenseuche zunächst weiter erhärtete. Die Untersuchung der Proben im Referenzlabor schloss *M. mycoides* als Erreger der Lungenseuche des Rindes aus. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Methode	**Ergebnis**
PCR spezifisch für Lungenseuche-Erreger	negativ
PCR spezifisch für alle Mykoplasmen-Spezies	positiv
PCR spezifisch für *Mycoplasma bovis*	Mycoplasma bovis
Kultur mit anschließendem Immunfluoreszenztest	Mycoplasma bovis

Bei weiteren bakteriellen Untersuchungen im Untersuchungsamt Potsdam konnte schließlich eine massive Pasteurellen-Pleuropneumonie nachgewiesen werden. Pneumonien bzw. Pleuropneumonien verursacht durch Pasteurellen werden auch in den einschlägigen Lehrbüchern als differenzialdiagnostisch bedeutsame Erkrankungen im Zusammenhang mit der Lungenseuche-Diagnose genannt.

2004 wurde vom Referenzlabor ein Ringversuch für die serologische Lungenseuche-Diagnostik mittels Komplementbindungsreaktion (KBR) organisiert. Dabei sollten elf Seren mit unterschiedlichem KBR-Titer untersucht werden. Insgesamt haben dreizehn Untersuchungsämter teilgenommen. In elf Labors ergaben sich gute bis sehr gute Übereinstimmungen mit den Vorgaben des NRL. Bei zwei Teilnehmern war eine Wiederholung des Ringversuches notwendig. Im Ergebnis wurden alle negativen Seren als solche erkannt. Bei den positiven Seren wichen die Ergebnisse der einzelnen Labors um ein bis zwei Titerstufen nach oben ab, wodurch eine fragliche Probe zum Teil als positiv beurteilt wurde. Insgesamt konnte der Ringversuch zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht werden.
Das NRL Lungenseuche arbeitete 2004 aktiv an der Fortentwicklung des Tierseuchenbekämpfungshandbuches (Arbeitsgruppe Lungenseuche) im Rahmen der Task Force Tierseuchenbekämpfung.

Alle zur Differenzialdiagnostik der Lungenseuche bedeutsamen Mykoplasmenstämme des Rindes wurden im Berichtszeitraum wiederum entsprechend der Notwendigkeit gepflegt (Überprüfung auf Wachstum sowie Identität, Anlegen neuer lyophilisierter Konserven).
Im Berichtszeitraum wurden 57 Seren und Antigene zur Durchführung der Lungenseuche KBR angefordert. Zur Durchführung der KBR können die Untersuchungsämter auch weiterhin durch das damalige BgVV zugelassene Lungenseuche-positive Referenz-Seren und -Antigene vom NRL beziehen.

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 BMVEL und der DG SANCO bezüglich der Weiterentwicklung der Rechtsvorschriften für die MKS und die SVD.

Nationales Referenzlabor für Milzbrand
(A. Raßbach)

Im Berichtszeitraum erhielten wir insgesamt elf Materialproben (Lederlappen-/Bodenproben) zur Untersuchung auf *Bacillus* (*B.*) *anthracis*. Dabei nutzten wir selektive Untersuchungsmethoden (Anthrax-Blutagar [Heipha, Deutschland]) und chromogene Kulturmedien (*Cereus*-Ident-Agar von Heipha oder BCM® *Bacillus cereus*/*Bacillus thuringiensis* plating medium von Biosynth AG, Schweiz), um im Probenmaterial enthaltene *B.-anthracis-Stämme* so schnell wie möglich von anderen eng verwandten *Bacillus*-Spezies zu unterscheiden, welche die Isolierung von *B. anthracis* erschweren können. Zur Unterdrückung vorhandener vegetativer Sporenbildner wurden die Proben jeweils für 20 min bei 80 °C inkubiert. Das Probenmaterial wurde zunächst direkt auf den entsprechenen Nährmedien sowie über Anthrax-Anreicherungsbouillon angelegt. *B. anthracis* wurde in keiner der untersuchten Proben kulturell nachgewiesen. Weiterhin wurden die Proben mittels nested PCR untersucht.
Die PCR mit den Primern GBR-4/GBR-5 und EWA- 1/EWA 2 ergaben für fünf Proben *B. anthracis* sowie *B. cereus* positive Amplifikationen. Dies erklärt sich daraus, dass mit dieser Primerkombination nach dem BLAST-Ergebnis auch *B. thuringiensis* und *B. cereus* erfasst werden, die üblicherweise im Boden vorkommen. Die Tatsache, dass die nested-PCR mit den Primerkombinationen PA5/8 und PA6/7 sowie CAP6/103 und CAP9/102 für die beiden Plasmide pX01 und pX02 sämtlich negativ verliefen, zeigte jedoch, dass virulente Stämme von *B. anthracis* im untersuchten Probenmaterial ausgeschlossen werden konnten.

Nationales Referenzlabor für Newcastle Disease
(O. Werner)

In der Richtlinie 92/66/EWG sind die Aufgaben des Nationalen Referenzlabors für ND definiert. Da nicht jedes aviäre Paramyxovirus vom Serotyp 1 als Erreger der ND gilt, sondern nur Viren ab einer bestimmten Virulenz, ist die Charakterisierung von Virusisolaten die wichtigste Aufgabe. Das erfolgt durch Serotypisierung mit spezifischen Antiseren gegen PMV-1 bis PMV-9. Mittels monoklonaler Antikörper werden aus den PMV-1-Isolaten lentogene Stämme vom Typ La Sota und Viren vom Taubentyp herausgefunden. Gelingt das nicht, wird die Pathogenität durch Sequenzierung der Spaltstelle des F-Gens oder im Tierversuch bestimmt.
Im Jahre 2004 wurden von regionalen Untersuchungsämtern und ausländischen Einrichtungen 120 verdächtige Virusisolate von Geflügel und Vögeln zur Charakterisierung an das Referenzlabor geschickt. Hier konnten insgesamt 66 als PMV-1 identifiziert werden. Vierzehn davon erwiesen sich als lentogen, davon dreizehn dem Vakzinestamm La Sota verwandt. Durch Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern konnten 48 Isolate als Taubentyp des PMV-1 eingestuft werden. Sie stammten überwiegend von Tauben, einige aber auch von anderen Vögeln und Ziergeflügel. Drei weitere PMV-1-Isolate von Tauben ließen sich serologisch nicht weiter differenzieren, erwiesen sich im Tierversuch aber auch als mesogen. Aus importierten Ziervögeln wurden während der Quarantäne in Deutschland relativ häufig hämagglutinierende Viren isoliert. Wir konnten 16 als PMV-2 und 25 als PMV-3 identifizieren. Sie sind gering pathogen für Geflügel. Alle Isolate wurden in die Virussammlung des Nationalen Referenzlabors aufgenommen.
Das Referenzlabor hat wieder erfolgreich am EU-Ringtest zur Diagnostik der Newcastle Disease und der aviären Influenza sowie am OIE-Ringtest zum Nachweis von NDV mittels RT-PCR teilgenommen.

Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose
(H. Köhler)

Auf der Basis der Ergebnisse der Validierung der in Deutschland zugelassenen ELISAs für den Antikörpernachweis gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*Map*) in Blutserum und Milch wurde gemeinsam mit Kollegen des IfE (L. Geue, Th. Selhorst) eine Stichprobenplanung zur Ermittlung des Paratuberkulose-Status der deutschen Rinderbestände durchgeführt. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass mit Hilfe der derzeit zur Verfügung stehenden serologischen Tests eine verlässliche Schätzung der Prävalenz der Paratuberkulose und damit eine Einschätzung der Paratuberkulosefreiheit auf Bestandsbasis und demzufolge auch auf nationaler Ebene im Herdenmaßstab nicht möglich ist.
Das NRL ist an einer Studie mehrerer Untersuchungseinrichtungen zur Optimierung der kulturellen Anzüchtung von *Map* auf festen Nährmedien beteiligt und führt in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Molekularbiologische Diagnostik der AVID eine Validierungsstudie für PCR-Systeme zum Direktnachweis von Map in Kotproben durch. Das NRL war außerdem in die Arbeitsgruppe zur Erarbeitung der bundeseinheitlichen Paratuberkulose-Leitlinien einbezogen.
Im Jahr 2004 wurden zehn Chargenprüfungen für ELISAs durchgeführt. Derzeit erfolgen die Laborprüfungen im Rahmen von zwei Zulassungsverfahren für PCR-Kits zum Direktnachweis von *Map* in Kot- bzw. Milchproben.

Nationales Referenzlabor für Psittakose
(K. Sachse)

Das NRL Psittakose bearbeitete im Jahre 2004 insgesamt 79 Proben im Zusammenhang mit Psittakose-Verdachtsfällen. Die Abklärungsuntersuchungen wurden mittels PCR und in einigen Fällen mit zusätzlicher DNA-Sequenzierung und BLAST-Analyse durchgeführt. Fast alle der genannten Proben stammten von Menschen. Von 42 Sputumproben erwies sich eine als *Chlamydophila-psittaci*-positiv. In 27 humanen Liquorproben wurde zweimal *Cp. psittaci* und zweimal *C. trachomatis* gefunden. Schließlich wurde auch in einer Lungengewebsprobe eines Menschen *Cp. psittaci* nachgewiesen (n=8). Des Weiteren wurden zwei Verdachtsproben von Ziervögeln eingesandt, welche beide an Hand von Kotproben als positiv bestätigt wurden.
Zur Abklärung der Rolle der Chlamydien bei Krankheitsgeschehen in Rinderbeständen unterstützte das NRL eine Reihe von Untersuchungsämtern, indem methodische Anleitung zur PCR gewährt wurde bzw. schwerwiegende und diagnostisch schwierige Fälle in unserem Labor bearbeitet wurden. Aus insgesamt 101 Rinderproben erwiesen sich 40 als Chlamydien-positiv. Die Einsendungen stammten vorwiegend aus Beständen mit Abortgeschehen und Euterproblemen, so dass die Anzahl der positiven Befunde keine Rückschlüsse auf die allgemeine Prävalenz der Chlamydien zulässt. 100 Lungengewebsproben aus Pferden mit respiratorischen Problemen wurden mittels PCR auf Chlamydien getestet. In dieser Gruppe wurde 13mal *C. psittaci* gefunden. Bei der Untersuchung von 48 Organproben aus Hirschen wurden in fünf Proben Chlamydien nachgewiesen.
Eingesandte Anzüchtungen in Zellkultur (n=14) wurden auf Chlamydien geprüft, elf davon erwiesen sich als positiv. In 22 Fällen wurde PCR-positives Gewebematerial zur Anzüchtung angelegt. Darunter befanden sich Milchproben von akut erkrankten Rindern (n=4) und Ziegen (n=4) sowie Darmgewebe von Mäusen in Laborhaltung (n=4) und Spermaproben von Ebern mit Verdacht auf Fertilitätsstörungen (n=4). Die Tatsache, dass in keinem Falle eine Anzucht der Chlamydien gelang, weist auf generelle Probleme der optimalen Probenkonservierung in der Zeitspanne von der Probenahme bis zur Anlieferung in das NRL hin.
Ein methodischer Schwerpunkt des NRL war die weitere Etablierung der Real-Time-PCR und ihre Übernahme in die Routinediagnostik. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Real-Time-PCR zum Spezies-spezifischen Nachweis des Psittakoseerregers *Chlamydophila psittaci* eingearbeitet, die im Jahre 2005 den Untersuchungsämtern zur Verfügung gestellt werden soll.

Nationales Referenzlabor für Rauschbrand
(F. Schulze)

Erreger des Rauschbrandes ist *Clostridium (C.) chauvoei*. Der Rauschbrand ist eine seuchenhaft und akut verlaufende, infektiöse, aber nicht kontagiöse Gasödemkrankheit, die meist junge Rinder sowie gelegentlich Schafe bzw. Ziegen befällt und durch die metastatische Bildung von Gasödemen in den großen Muskelpartien gekennzeichnet ist. Der seuchenhafte Verlauf beim Rind macht die vorrangige Bekämpfung des Rauschbrandes gegenüber den anderen Clostridieninfektionen erforderlich. Er tritt nur in bestimmten Gebieten, so genannten Rauschbranddistrikten, auf. In der Bundesrepublik sind dies vor allem die Weser-Ems-Niederungen und die Voralpenregion. *C. chauvoei* muss von anderen Gasödemerregern, insbesondere von *C. septicum*, dem Erreger des Pararauschbrandes, abgegrenzt werden.
Für die Differenzierung von *C. chauvoei* und *C. septicum* wurde ein PCR-Assay eingearbeitet. 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 dem Restriktionsenzym 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 (1.020 und 357 bp). Als Vergleichsmaterial dient die DNA der entsprechenden Typstämme.
Gegenwärtig laufen Arbeiten zur Einarbeitung der PFGE für *C. chauvoei*. Im Berichtszeitraum erfolgten keine Einsendungen.

Nationales Referenzlabor für Rotz
(A. Raßbach)

Im internationalen Tierhandel müssen alle Equiden einer serologischen Untersuchung u. a. auf Rotz-spezifische Antikörper unterzogen werden. Als vorgeschriebenes Verfahren für den internationalen Handel wird im OIE-Handbuch die Komplementbindungsreaktion (KBR) beschrieben. Die Bewertung der Ergebnisse der KBR wird jedoch durch eine Reihe von serologischen Kreuzreaktionen mit anderen Mikroorganismen (z. B. Pseudomonaden, Streptokokken) beeinträchtigt. Im Jahr 2004 erhielten wir 106 Blut- bzw. Serumproben zur Untersuchung. Dabei wurden uns 15 Serumproben als Verdachtsproben zugeschickt. In der KBR bestätigten wir in acht dieser 15 Proben die von den Untersuchungsämtern bereits festgestellte Reaktion. Zwei Proben waren in der KBR negativ und fünf Proben reagierten mit dem Phänomen der Eigenhemmung. Weiterhin stellten wir in einer der 91 Routineproben ebenfalls eine Reaktion mit dem Rotzantigen fest. Zur Abklärung dieser Reaktion wurde der Immunoblot (Western Blot) eingesetzt. Im Western Blot wurden keine Rotz-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Western Blot ist eine geeignete Methode, um falsch-positive Ergebnisse in der KBR im Rahmen der Rotzdiagnostik zu erkennen.
Die KBR-Rotzdiagnostika (*Malleus*-Antigen und positives *Malleus*-Kontrollserum) wurden im Rahmen eines Zulassungsverfahrens geprüft und das Prüfprotokoll erstellt. Damit wurde sichergestellt, dass ab 01.01.2004 in Deutschland derartige Diagnostika zugelassen werden konnten. Somit können alle Untersuchungsämter in Deutschland die Rotz-Handelsuntersuchungen, auch ohne Antrag auf Erteilung einer Ausnahmegenehmigung zum Einsatz derartiger Diagnostika, durchführen.

Nationales Referenzlabor für Salmonellose der Rinder
(U. Methner)

Ein wesentlicher Schwerpunkt der Aufgaben des NRL Salmonellose der Rinder sind Untersuchungen zur Epidemiologie der Salmonellose in Rinderbeständen, insbesondere zur Wirksamkeit von eingeleiteten Bekämpfungsmaßnahmen nach amtlicher Feststellung der Salmonellose in einem Bestand. Damit sollen auch allgemeingültige Erkenntnisse gewonnen werden, um eine bessere Beratungsfunktion gewährleisten zu können. Im Berichtszeitraum wurden durch das NRL Salmonellose der Rinder in Zusammenarbeit mit den zuständigen Veterinärbehörden und den Untersuchungsämtern drei regionale 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 Erregerdifferenzierung 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 inaktivierten Impfstoffen gegen Salmonellen in bereits infizierten Beständen untersucht werden.

Nationales Referenzzentrum für BSE/Scrapie
(M.H. Groschup)

Das FLI nimmt die Aufgaben des nationalen Referenzzentrums (NRZ) für die BSE- und Scrapie-Diagnostik wahr. In dieser Funktion wurden im Jahr 2004 insgesamt 161 BSE- und 133 Scrapie-Verdachtsfälle mittels einer der in der EU zugelassenen OIE-Methoden (Immunoblot und/oder immunhistochemische Untersuchung) abgeklärt. Bei 65 Rindern und 120 Schafen bestätigte sich der BSE- bzw. Scrapie-Verdacht. Allerdings ist die Zahl der von Scrapie-Ausbrüchen betroffenen Herden niedriger, da im Rahmen der Herdentötung in einigen Fällen bei bis zu 50 Schafen einer Ursprungsherde Scrapie diagnostiziert wurde. 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. Bei keinem der untersuchten Fälle wurden Hinweise auf eine BSE-Infektion festgestellt.
Es wurden im Jahr 2004 vier neue Zulassungsanträge bearbeitet. Im Rahmen der laufenden Chargenprüfung für die bereits zugelassenen Schnelltests wurden insgesamt 53 Chargen geprüft und zum Verkehr freigegeben.
Das NRZ nahm 2004 an Ringversuchen (Veterinary Laboratory Quality Assessment) des VLA teil. Es wurden zwei Ringversuche zur histologischen BSE- und Scrapie-Untersuchung durchgeführt sowie ein Ringversuch zur Schnelltest-Durchführung. Zur histologischen Bewertung erhielt das INNT 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 an das VLA weitergeleitet.
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.
Damit steigt die Zahl der Ringversuche, an denen das BSE- und Scrapie-NRL seit dem Jahre 2002 erfolgreich teilgenommen hat, auf insgesamt dreizehn.
Zwei der in die diagnostischen Arbeiten involvierten wissenschaftlichen Mitarbeiter nahmen am jährlichen Arbeitstreffen der nationalen TSE-Referenzlabors teil, das vom EU-Referenzlabor in Weybridge, Großbritannien, durchgeführt wurde.

OIE- und Nationales Referenzlabor für Tollwut; WHO-Referenzzentrum für Tollwut
(Th. Müller)

Das WHO Referenzzentrum für Tollwut des FLI arbeitete in 2004 im Rahmen eines WHO Projekts zur Entwicklung eines monoklonalen Antikörper (mAk)-Cocktails für die post-expositionelle Impfung beim Menschen mit. Darüber hinaus nahm das WHO Referenzzentrum für Tollwut des FLI an der 9. Expertenkonsultation der WHO zur Tollwut in Genf am 04.-08. Oktober 2004 teil.
Anfragen jeglicher Art zur Tollwut, auch solche aus dem Ausland, werden regelmäßig an das WHO-CC am FLI weitergeleitet. Das trifft auch auf labordiagnostische Untersuchungen für die Humanmedizin zu. So war das NRL für Tollwut 2004 in die *in vivo* und post mortem Diagnose eines importierten humanen Tollwutfalles in Deutschland eingebunden. Ein 51-jähriger Mann starb am 29.05.2004 infolge einer Tollwutinfektion, die er sich nach epidemiologischen Recherchen in Indien zugezogen hatte. Während die *in vivo* Diagnostik negativ verlief, konnte die endgültige Diagnose nur post mortem gestellt werden. Die Virustypisierung bestätigte das Vorliegen eines Hundetollwutstammes.

Das Referenzlabor hat erfolgreich an zwei internationalen Ringversuchen zur serologischen Diagnostik von Hunde- und Katzenseren im Rahmen der Einreise in tollwutfreie Regionen teilgenommen.

Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor (NVRL) für Tuberkulose
(I. Moser)

Das NVRL für Tuberkulose hat die Aufgabe, im Rahmen der Bekämpfung der Rindertuberkulose bzw. der Aufrechterhaltung des Status „amtlich frei von Tuberkulose" bei der Abklärung von Infektions- bzw. Krankheitsgeschehen, die im Zusammenhang mit dem Nachweis „säurefester Stäbchen" stehen, durch weitergehende Differenzierung und Identifizierung des Erregers mitzuwirken. Dies geschieht durch Kombination konventioneller und molekularbiologische Methoden. Eingesandte Bakterienisolate werden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf ihre Zugehörigkeit zum Komplex der eigentlichen Tuberkulose-Erreger (*M. tuberculosis* complex) überprüft. Diesem Komplex werden heute folgende Spezies zuordnet: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum* und *M. microti*, wobei *M. caprae* bis vor kurzem noch als Subspezies von *M. bovis* angesehen wurde. Sie ist mit *M. bovis* nahe verwandt, unterscheidet sich jedoch deutlich in einigen molekularen Parametern und bildet im phylogenetischen Dendrogramm ein separates Cluster. Für *M. pinnipedi* (früher: *Mycobacterium* typ seal), erstmals beschrieben als Erreger der Tuberkulose bei Robben, wurde im Jahre 2003 ebenfalls der Vorschlag gemacht, den Erreger in den Rang einer eigenen Spezies zu erheben.
Die exakte Spezieszugehörigkeit wird durch „Spoligotypisierung" geklärt, eine Methode, die bis zu einem gewissen Grad auch eine Differenzierung auf der Subspezies- und Subtyp-Ebene innerhalb dieses Komplexes ermöglicht. Eine weitere molekulare Methode, die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) auf der Basis des IS*6110*, kann zur Abklärung epidemiologischer Zusammenhänge angewandt werden. Sie erlaubt eine differenziertere Aussage als die Spoligotypisierung in Bezug auf die genetische Ähnlichkeit verschiedener Isolate. Bei *M. bovis* ist diese Methode jedoch aufgrund der geringen Kopienzahl des IS*6110* in den meisten Fällen wenig geeignet. Daher wurde begonnen, eine neue PCR-basierte Methode, die Typisierung aufgrund von „variable number of tandem repeat"-Sequenzen, im NVRL zu etablieren. Diese Methode besitzt eine höhere Unterscheidungsfähigkeit als die Spoligotypisierung, ist jedoch weniger aufwändig als die RFLP-Methode.
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. Um die lange Zeit der Diagnosestellung abzukürzen, wird bei *M. bovis*-Verdacht parallel zur Kultur, die noch immer als „Goldstandard" und sicherste Nachweismethode gilt, die DNS des Erregers aus Organproben direkt isoliert und der molekularen Diagnostik zugeführt. Dies verkürzt den Prozess der Diagnosestellung von mehreren Wochen auf wenige Tage. Der vorläufige Befund wird jedoch regelmäßig durch Anzüchtung des Erregers bestätigt.
Insgesamt wurden 497 Organproben und Bakterienisolate von 93 Rindern aus zehn im Jahr 2004 gemeldeten Ausbrüchen, 138 Schweinen 23 Hühnern, 23 Wild-, Zoo- und Heimtieren (Elefant über Fasan bis Chamäleon), vierzehn Proben aus anderen Quellen (Torf, Wasser, Milch/Milchfilter), die eingesandt worden waren, auf Mykobakterien untersucht und differenziert. Darüber hinaus wurden 77 Mykobakterienisolate, die in Untersuchungsämtern bereits angezüchtet worden waren, zur weiteren Differenzierung eingesandt.

Ein Wissenschaftler aus Charkow, Ukraine, war für fünf Monate im NVRL für Tuberkulose zu Gast (DAAD), um ein weiterführendes Methoden-Training zu absolvieren.
Im Rahmen des Twinning-Projektes TR02/IB/AG-01 mit der Türkei war ein Wissenschaftler für vierzehn Tage zu Gast am NVRL für Tuberkulose, um ein grundlegendes Methodentraining für molekulare Diagnostikmethoden zu absolvieren.

Nationales Referenzlabor für Vibrionenseuche der Rinder
(F. Schulze)

Der Erreger der bovinen genitalen Campylobacteriose (bgC) – früher als Vibrionenseuche der Rinder bezeichnet – ist *Campylobacter* (*C.*) *fetus* ssp. *venerealis*, ein Bakterium mit ausgeprägtem Tropismus für die Genitalschleimhaut des Rindes (enzootischer Abort). Hiervon zu unterscheiden sind Infektionen mit *C. fetus* ssp. *fetus*. Dieser Keim hat sein natürliches Erregerreservoir im Intestinaltrakt des Rindes und kann ebenfalls Aborte verursachen (sporadischer Abort).
Im Jahre 2004 erfolgten 22 Einsendungen aus sieben Untersuchungseinrichtungen mit insgesamt 37 Isolaten. Die Überprüfung mittels PCR ergab 23 *C. fetus* ssp. *venerealis* und drei *C. fetus* ssp. *fetus* Nachweise. Elf Isolate gehörten nicht zur Spezies *C. fetus*.
Die von uns etablierte PCR zur Identifizierung und Differenzierung der beiden *C.-fetus*-Subspezies (Müller, W. et al., Dtsch. Tierärztl. Wschr. 110, 55-59, 2003) wurde ebenfalls zur Untersuchung von 83 Feldisolaten bzw. Sammlungsstämmen (darunter 32 *C. fetus* ssp. *venerealis* und 27 *C. fetus* ssp. *fetus*) eingesetzt. Kürzlich wurde die Zuverlässigkeit dieser PCR in Frage gestellt (Bovine Genital Campylobacteriosis, OIE Manual 2004). Zur Klärung dessen wurden in unseren Untersuchungen sieben weitere phänotypische Schlüsselreaktionen (Empfindlichkeit gegen Glycin, Metronidazol, Cefoperazon, $KMnO_4$, basisches Fuchsin sowie Selenitreduktion und Wachstum bei 42 °C) einbezogen. Bisher wurden 62 *C.-fetus*-ssp.-*venerealis*- und 15 *C.-fetus*-ssp.-*fetus*-Feldisolate geprüft. Es konnten keine Diskrepanzen zwischen der PCR und den Ergebnissen der phänotypischen Differenzierung (besonders Resistenz gegen 1 % Glycin) beobachtet werden, allerdings erfordert die Standardisierung der phänotypischen Tests einen erheblichen Arbeitsaufwand.
Im Berichtszeitraum wurden im Referenzlabor zwei Stellungnahmen zu Fragen der Bekämpfung der bgC, insbesondere zur Verwendung des Samens *C.-fetus*-ssp.-*venerealis*-positiver Bullen, zur Problematik ‚Natürlicher Deckakt – künstliche Besamung' und zur Aktualität der in der Rinder-Deckinfektionen-Verordnung vorgeschriebenen Bekämpfungsmaßnahmen erarbeitet. Die Schlussfolgerungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:
Da die bgC in vielen Beständen seit Jahren nicht mehr nachgewiesen wurde, wird sie von manchen Rinderhaltern (und möglicherweise Tierärzten) in ihrer Bedeutung unterschätzt. Die Überwachung auf das Freisein von dieser Tierseuche stellt aber nach wie vor eine aktuelle Aufgabe dar. Die in den letzten Jahrzehnten erzielten Erfolge bei der Bekämpfung der bgC belegen, dass die zur Verfügung stehenden Instrumentarien bei sachgerechter Anwendung eine erfolgreiche Bekämpfung dieser Deckinfektion erlauben. Diese Erfolge sind nur bei enger Zusammenarbeit zwischen der Untersuchungseinrichtung und den im Rinderbestand tätigen Mitarbeitern möglich. Ebenso wie die Isolierung stellt auch die phänotypische Differenzierung von *C. fetus* ssp. *venerealis* an das mikrobiologische Labor hohe Anforderungen und setzt entsprechende Erfahrungen voraus. Neben dieser exakten Diagnose kommt der konsequenten Umsetzung der in der Rinder-Deckinfektionen-Verordnung formulierten Bekämpfungsmaßnahmen entscheidende Bedeutung zu.
Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist die erfolgreiche Bekämpfung der bgC nur mit *C.-fetus*-ssp.-*venerealis*-freien Bullen möglich. Das bezieht sich auf den natürlichen Deckakt und gleichermaßen auf die künstliche Besamung. Bei beiden Verfahren sind die gleichen

Anforderungen an den Gesundheitsstatus der Tiere zu stellen. Jedes Abweichen von dieser Prämisse birgt Risiken. Wie die in der Richtlinie 2003/43/EG formulierten tierseuchenrechtlichen Anforderungen belegen, besteht hierin in der europäischen Gemeinschaft Konsens. Dieser Konsens beruht auf jahrzehntelangen Erfahrungen, die bei der Bekämpfung der bgC gesammelt wurden. Uns liegen keine Hinweise vor, die in absehbarer Zeit ein Abweichen von diesem Konzept denkbar erscheinen lassen.

Nationales Referenzlabor für Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen
(F. Melzer)

Nach einer Einarbeitungsphase sind die Aufgaben des Referenzlabors seit Anfang 2004 vollständig im FLI angesiedelt. Diese umfassen die Unterstützung der Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer bei der Überwachung der Brucellosefreiheit in den landwirtschaftlichen Nutztierbeständen. In diesem Rahmen werden im Referenzlabor Abklärungsuntersuchungen durchgeführt, die kommerziell angebotenen und zugelassenen Diagnostika (ELISA, Antigene, Kontrollseren) durch Chargenprüfungen qualitativ überwacht bzw. neue Produkte in Zusammenarbeit mit der Zulassungsstelle überprüft und Mangeldiagnostika zur Verfügung gestellt.
Im letzten Jahr wurden im Referenzlabor insgesamt 128 Blutproben zur Abklärung unklarer Befunde der Untersuchungslaboratorien in den Bundesländern an das NRL eingesandt. Im Einzelnen waren das 65 Proben vom Rind, 38 vom Schwein und 20 vom Schaf bzw. von der Ziege. Vier untersuchte Seren stammten aus einer Alpaka-Herde und eine Probe vom Wildschwein. Spezifische Brucella-Antikörper konnten lediglich bei Letzterer nachgewiesen werden. In allen anderen Fällen ergaben die Untersuchungen Hinweise auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *Yersinia enterocolitica* O9. Dabei wurden verschiedenen serologische Untersuchungsmethoden parallel angewendet.
Im gleichen Zeitraum wurden von uns 56 Serumproben vom Schaf auf Antikörper gegen *B. ovis* untersucht und negativ befundet. Es handelt sich hierbei um eine Exportuntersuchung, die wir nur in Einzelfällen von Untersuchungsämtern übernehmen, welche wegen der geringen Anzahl der Fälle diese Methode nicht vorhalten können. Gleichzeitig stellt das NRL den anderen Laboren Antigen und Kontrollseren zur *B. ovis*-Serologie zur Verfügung. Dies gilt auch für die *B.-canis*-Diagnostik. In sechs Fällen wurde die Untersuchung auf *B. canis*-Antikörper im NRL durchgeführt. Zwei Bakterienisolate wurden zur Diagnose bzw. Differenzierung eingesendet. Bei einem Isolat konnte nachgewiesen werden, dass es sich nicht um *Brucella* spp. handelt. Das zweite Isolat wurde als *Brucella suis* Biotyp 2 identifiziert.
Im Berichtszeitraum gab es einen Ausbruch von Schweinebrucellose in einem Freilandbestand in Mecklenburg-Vorpommern.
Im November 2004 nahm das NRL an einem europäischen Ringversuch des VLA Weybridge teil. Dabei wurden 159 Serumproben mit einer Vielzahl von Methoden untersucht. Eine vergleichende Auswertung aus Großbritannien liegt noch nicht vor.

Nationales Referenzlabor für *Tritrichomonas foetus*
(K. Henning)

Die so genannte Trichomonadenseuche des Rindes wurde in Deutschland zuletzt 1997 festgestellt. Jedoch soll die Infektion in einzelnen Fällen bei aus Deutschland exportierten Rindern diagnostiziert worden sein. Einige der bisher in Deutschland verwendeten diagnostischen Nachweisverfahren, insbesondere der direkte mikroskopische Nachweis in Nativpräparat, gelten als wenig sensitiv. Daher wurden Kultivierungsverfahren etabliert, die als

weitaus sensitiver gelten. Da es seit kurzem Hinweise gibt, dass Rinder in ihrem Genitaltrakt morphologisch von *T. foetus* nicht unterscheidbare Flagellaten beherbergen können, die apathogen zu sein scheinen, wurde in der Arbeitsgruppe eine PCR-Technologie entwickelt, die sowohl den gattungsspezifischen Nachweis von *Tritrichomonas spp.* als auch die Abgrenzung der Art *T. foetus* von anderen Trichomonaden gestattet. Ein PCR-Verfahren wird auf seine Eignung als Alternative zu den herkömmlichen Nachweisverfahren geprüft. Darüber hinaus wurde eine Sammlung von Trichomonaden-Isolaten für Vergleichszwecke angelegt.

Nationales Referenzlaboratorium für Caprine Arthritis/Encephalitis und Maedi/Visna
(D. Beier)

Bei der Caprinen Artheritis/Encephalitis (CAE) handelt es sich um eine in ihrer Pathogenese langsam fortschreitende Virusinfektion mit einem Lentivirus, das antigene Gemeinsamkeiten mit dem Maedi/Visna Virus (MVV) der Schafe aufweist. Zielzellen der Erreger sind Monozyten und Makrophagen. Nach der Infektion kommt es zu einer sehr langsamen Virusvermehrung, so dass antivirale Antikörper wegen der ineffizienten Immunantwort oft erst Monate p.i. nachweisbar sind. Die Diagnostik erfolgt auf Grund des klinischen Verdachtes und/oder des Antikörpernachweises. Virus und Antikörper persistieren lebenslang, Impfungen und Therapie stehen nicht zur Verfügung. Kolostrum und Milch infizierter Tiere stellen wichtige Infektionsquellen dar und könnten im Sinne des Verbraucherschutzes bei der zunehmenden Verarbeitung von Milch kleiner Wiederkäuer für die menschliche Ernährung in die Kritik geraten.
Im Gegensatz zu MVV ist die CAE in der Bundesrepublik Deutschland nicht meldepflichtig, wird aber in einigen Gebieten auf freiwilliger Basis oder auf Initiative von Ziegen-Zucht-Verbänden sowie in Länderhoheit bekämpft.

Nationales Referenzlabor für Muschelkrankheiten
(S.M. Bergmann)

Im Nationalen Referenzlabor für Muschelkrankheiten (NRL-Mu) sind verschiedene Methoden zum Nachweis der gelisteten Parasitosen Marteiliose und Bonamiose bei der Europäischen Flachauster (Ostrea edulis) sowie zum Nachweis der parasitären Erreger der Haplosporidiose, Perkinsose und Mikrozystose bei verschiedenen Muschelarten etabliert. Neben der klassischen Histologie nach HE- und Haemacolor-Färbung werden die PCR und die *In-situ*-Hybridisierung mit Bismarck-Brown Y-Gegenfärbung durchgeführt.
Im Jahr 2004 wurden die Fischgesundheitsdienste in Baden-Württemberg und Sachsen-Anhalt bei der Abklärung von ungewöhnlichen Massensterben verschiedener Muschelarten im Süßwasser durch Hinweise zur Probennahme und zur Diagnosestellung beraten.

Nationales Referenzlabor für durch Zecken übertragene Krankheiten (NRL-ZüK)
(J. Süss)

Das NRL-ZüK wurde 1999 gegründet. Im Zuge der Umstrukturierung des gesundheitlichen Verbraucherschutzes wurde das Referenzlabor per Erlass BMVEL zum 1.1.2004 in das Friedrich-Loeffler-Institut eingegliedert. Deshalb erfolgte 2004 die bauliche, personelle, apparative und methodische Installation des Labors am Standort Jena des FLI.
In Deutschland ist bekanntlich die wichtigste durch Zecken übertragene Viruserkrankung die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und die wichtigste durch Zecken übertragene

bakterielle Erkrankung die Lyme Borreliose (LB). Von untergeordneter oder unbekannter Bedeutung sind demgegenüber die Babesiose, Anaplasmose, verschiedene Rickettsiosen und andere durch Zecken übertragene Viruserkrankungen. Die meisten dieser Erkrankungen sind „emerging zoonoses“. FSME und LB sind sehr bedeutende menschliche Erkrankungen, es treten daneben aber auch FSME-Erkrankungen mit einer neurologischen Symptomatik bei Hunden auf.

Nach heutigem Wissensstand auf dem Gebiet der LB treten klinische Erkrankungen durch *Borrelia burgdorferi* s.l. auch bei Pferden (Eseln), Hunden und Rindern auf. Die Bedeutung der LB bei Schafen, Katzen und verschiedenen Zootieren ist unklar bzw. es liegen kaum Daten vor. In Ziegen wurden Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* nachgewiesen aber keine klinischen Verläufe beobachtet. Auch über serologisch positive Wildschweine ist berichtet worden. Fasane sind, wie andere Vögel auch, Reservoirwirte von *Borrelia burgdorferi*, klinische Erscheinungen konnten nicht beobachtet werden.

Nach der Installation des NRL-ZüK am FLI bietet das Labor folgende Leistungen an: Beratung zu medizinischen und veterinärmedizinischen Fragen im Zusammenhang mit FSME, LB und weiteren durch Zecken übertragenen Krankheiten, Beurteilung von FSME-Risikogebieten in Deutschland und Europa, Beratung zur Biologie von Zecken und zur allgemeinen Zeckenstich-Prophylaxe sowie Beratung zu anderen durch Zecken übertragenen Krankheiten.

Im Labor werden Untersuchungen zum FSME-Virusnachweis in Zecken (nRT-PCR) und zum Nachweis des Virus in Liquor und Serum durchgeführt.

In jedem zweiten Jahr organisiert das NRL-ZüK das „International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases (IPS). Das 8. IPS wird vom 10.-12. 3. 2005 in Jena organisiert.

Referenzlaboratorien	**Rechtsgrundlage**
Afrikanische Schweinepest (Diagnostik nur am FLI)	EU RL 92/119 sowie Ausführungshinweise zur Schweinepest-VO
Ansteckende Schweinelähmung (Teschen-Talfan-Disease)	EU RL 92/119 in Verb. mit SVD-VO bzw. Änderung der Sperrbezirks-VO
Arthritis-Enzephalitis der Ziege	BMVEL-Auftrag
Aujeszkysche Krankheit	EU Entsch. 93/24 in Verb. mit EU RL 64/432 und 93/244 sowie Aujeszky-VO
Bovine Herpesvirus 1-Infektionen	EU RL 93/42 in Verb. mit EU RL 95/109 und BHV-1-VO
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)	EU RL 93/53 in Verb. mit EU RL 91/67 und EU RL 92/532
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 SP – VO und Tierimpfstoff-VO
Lungenseuche der Rinder	EU RL 82/894 VO über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 11.04.2001
Maedi/Visna	BMVEL-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
Paratuberkulose	BMVEL-Auftrag
Pferdepest (Diagnostik nur am FLI)	EU RL 92/35 in Verb. mit VO Anzeigepflichtige Tierseuchen
Psittakose	Psittakose-VO, Neufassung vom 14. Nov. 1991, geändert durch VO vom 14. Okt. 1999 RL 92/65/EWG vom 13. Juli 1992
Rauschbrand	VO zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen

Referenzlaboratorien	**Rechtsgrundlage**
Rotz	Tierseuchenrechtliche Vorschriften Entscheidung der Kommission vom 5. Feb. 1993 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen und die Beurkundung für die Einfuhr von registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden Gesundheitsbescheinigung für Einhufer III – 93/197/EWG
Salmonellose der Rinder	VO über anzeigepflichtige Tierseuchen Rinder-Salmonellose-VO
Tuberkulose der Rinder	Zoonosenrichtlinie 92/117/EWG (ABl. EG Nr. L 62/93)
Vibrionenseuche der Rinder	VO zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen

IV Wissenschaftliche Zusammenarbeit

Zusammenarbeit mit anderen Anstalten, Institutionen und Organisationen

Inland

Agrar- und Umweltanalytik GmbH/JenaGen GmbH, Jena
Bayer AG, Leverkusen/Monheim
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim
Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, Projektgruppe HI-Tier
BALVI GmbH Lübeck
Boehringer Ingelheim, Ingelheim/Biberach a.d. Riss
Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittelsicherheit, Karlsruhe
Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstökologie und Walderfassung
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, Außenstelle Heidelberg
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Sitz Fellbach
Clondiag Chip Technologies, Jena
Deutsches Krebsforschungszentrum, Genome Modification and Carcinogenesis, Heidelberg
E. Jaeger GmbH/VIASYS Healthcare GmbH, Würzburg
Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Medizinische Klinik
Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Organische Chemie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institute of Public Health
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Medizinische Mikrobiologie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Pharmazie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Transfusionsmedizin
FILT Forschungsgesellschaft für Lungen- und Thoraxerkrankungen mbH, Berlin-Buch
Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb), Bad Langensalza
Freie Universität Berlin, Institut für Geflügelkrankheiten
Freie Universität Berlin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Freie Universität Berlin, Institut für Vet. Biochemie
Freie Universität Berlin, Institut für Veterinär-Physiologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Medizinische Mikrobiologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Klinikum, Institut für Virologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für molekulare Zellbiologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Neuropathologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Physikalische Biologie
Hygiene Institut Hamburg, Abteilung Mikrobiologischer Verbraucherschutz
Impfstoffwerk Dessau Tornau
Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT), Berlin
Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin
Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Parasitologie
Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Veterinär-Pathologie
Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Virologie
Justus-Liebig-Universität Gießen, Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei MV, Institut für Fischerei, Ltr. der Außenstelle Born

Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Koblenz
Ludwig-Maximilians-Universität München, Tiermed. Fakultät, Institut für Geflügelkrankheiten
Ludwig-Maximilians-Universität München, Tiermed. Fakultät, Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, München
Ludwig-Maximilians-Universität München, Tiermed. Fakultät, Institut für Molekulare Tierzucht, München
Ludwig-Maximilians-Universität München, Tiermed. Fakultät, Institut für Pathologie, München
NABU Gebietsvereinigung West-Havelland
Niedersächsische Tierseuchenkasse Hannover
Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems
Robert-Koch-Institut, Berlin
Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Ruhr-Universität Bochum, Abteilung für Allgemeine und Spezielle Pathologie
Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Mikrobiologie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Virologie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für kleine Klauentiere und forensische Medizin und Ambulatorische Klinik
Technische Universität Freiberg, Institut für Stochastik
Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz
Thüringer Tierseuchenkasse, Weimar
Tiergesundheitsdienst Thüringen e.V., Bad Langensalza
Tierpark Stralsund, Hansestadt Stralsund
Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle GmbH, Sektion Ökosystemanalyse
Universität Dortmund, Fachbereich Statistik
Universität Frankfurt/M., Institut für Biochemie
Universität Freiburg, Institut für Virologie
Universität Heidelberg, Medizinische Universitätsklinik
Universität Heidelberg, ZMBH
Universität Hohenheim, Institut für Genetik
Universität Hohenheim, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik
Universität Kiel
Universität Konstanz, Ag Umwelttoxikologie
Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Institut für Bakteriologie und Mykologie
Universität Mainz
Universität München, Sonderforschungsbereich Räumliche Statistik
Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie
Universität Rostock, Institut für Bodenkunde/AG Agrobiotechnologie
Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbiologie
Universitätsklinikum Kiel, Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Veterinäruntersuchungsämter und Fischgesundheitsdienste der Bundesländer
Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr
Zentralinstitut für Agrarnutzungs- und Landnutzungsforschung (ZALF), Müncheberg

Ausland

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Ploufragan, Frankreich
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA-Alfort), Unité de Zoonoses Bactériennes, Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses, Maisons-Alfort cedex, Frankreich
Animal Health Institute, Debrecen, Ungarn
Animal Health Service, Deventer, Niederlande
Animal Health Trust, Newmarket, Großbritannien
Animal Parasitology Institute, US Department of Agriculture, Beltsville, USA
Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), Department of Defense, Washington, D.C., USA
Biological Research Center, Szeged, Ungarn
Bundesamt für Veterinärwesen Bern, Schweiz
Bundesministerium für Soziale Sicherheit und Generationen der Republik Österreich
Bundesuniversität von Bahia, Tierärztliche Hochschule, Salvador – Bahia, Brasilien
Campus Agrario, Veterinária UP, Vairao, Portugal
Centraal Diergeneeskundig Institut, Lelystad, Niederlande
Central Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin, Irland
CISA-INIA, Valdeolmos, Spanien
CODA-CERVA, Department of Virology, Section Modelisation of Epizootic Diseases, Ukkel, Belgien
Columbia University, Infectious Disease Laboratory, New York, USA
Cornell University, Ithaca, USA
CSIRO Division of Animal Health, Geelong, Victoria, Australien
DLO-Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad, Niederlande
Danish Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, Dänemark
Danish Veterinary Laboratory and Community Reference Laboratory for Fish Diseases, Aarhus, Dänemark
Estonia Veterinari and Food Laboratori, Tartu, Estland
European Food Safety Authority (EFSA), Brüssel, Belgien
Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pathology, Federal Univ. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasilien
Flanders Interuniversity Institute of Biotechnology, Vrije Universiteit Brüssel, Belgien
Fort Dodge Veterinaria SA Carretera Camprodon, Vall de Bianca, Spanien
Fox Chase Cancer Center, Basic Science Division, Philadelphia, PA, USA
Gesamtrussisches Forschungsinstitut für Tiergesundheit, Abteilung für neuartige Krankheiten, Jurevets, Wladimir, Russische Föderation
INSERM, Strasbourg, Frankreich
Institut für Veterinärmedizin, Abteilung für Tollwut, Kiew, Ukraine
Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, Mittelhäusern, Schweiz
Institute for Animal Health, Pirbright, Großbritannien
Institute for Immunology (V), Biomedical Center, Uppsala, Schweden
Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Charkow, Ukraine
Institute of Human Virology, Baltimore, USA
Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo, Spaniel
Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, Frankreich
Institut für Virologie und Immunprophylaxe, Mittelhäusern, Schweiz
International Research Centre, Pentlands Science Park, Edinburgh, Großbritannien
Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Ozzano Emilia, Italien
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia, Brescia, Italien
IZS Brescia, Italien
Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, Kumasi, Ghana

Leiden University Medical Center, Department of Virology, Center of Infectious Diseases, Leiden, Niederlande
Liverpool School of Tropical Medicine, Department of Parasitology, Liverpool, Großbritannien
Ministerio de Agricolture, Pesca y Alimentacion, Istituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria, Alimentaria, Madrid, Spaniel
Ministry of Agriculture, Forestry and Food of the Republic of Slovenia, Veterinary Admnistration
Ministry of Agriculture and Forestry of the Republic of Croatia
Ministry of Agriculture and Forests, National Veterinary Service, Bulgarien
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, General Directorate of Protection and Control, Türkei
Moredun Research Institute, International Research Centre, Penicuik, Edinburgh, Großbritannien
National Diagnostic and Research Veterinary Institute, Sofia, Bulgarien
National Research Institute for Aquaculture, Tamaki, Japan
National Veterinary and Food Research Institute (EELA), Helsinki, Finnland
National Veterinary Institute, Oslo, Norwegen
National Veterinary Institute, Uppsala, Schweden
National Veterinary Laboratory Vilnius, Litauen
Norwegian School of Veterinary Science, Dept. of Morphology
Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Mödling, Österreich
Oregon State University, College of Veterinary Medicine, Department of Biomedical Sciences, Corvallis, Oregon, USA
Patologia de Organismos Marinos, Instituto de Investigaciones Marinas, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Vigo, Spanien
PIWET, Pulawy, Polen
Quantitative Veterinary Epidemiology Group (QVE), Animal Sciences Group, Wageningen UR, Division of Infectious Diseases, Niederlande
Queens GIS Lab, Queens University, Kingston, Ontario, Kanada
Queens University of Belfast, Department of Veterinary Sciences, Virology Department, Belfast, Nordirland
Royal Veterinary College, University of London, Großbritannien
Scarab Genomics, Madison, WI, USA
School of Veterinary Medicine, Department of Pathobiological Sciences, Baton Rouge, Louisiana, USA
Sokoine University of Agriculture Morogoro, Department of Veterinary Microbiology and Parasitology, Tansania
St. George's Hospital Medical School, Department of Surgery, London, Großbritannien
State Veterinary Administration of the Czech Republic
Stefan Angelov Institute of Microbiology, Sofia, Bulgarien
Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. Ruminant Medicine and Veterinary Epidemiology, Uppsala, Schweden
The Hebrew University, Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel
Tufts University, School of Veterinary Medicine, MA, USA
Turku Centre for Biotechnology, Turku, Finnland
UCD, Department of Veterinary Microbiology & Parasitology, Dublin, Irland
Unité de Virologie et Immunologie moléculares, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich
United States Department of Agriculture, Beltsville, USA
Universidad Autonoma, Centro de Biologia Molecular, Madrid, Spanien

Universidad Autonoma, Faculdad de Medicina Veterinaria y Zootecnica, Mexico
Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Dpto. Patologia Animal, Madrid, Spanien
Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Dpto. Sanidad Animal, Madrid, Spanien
Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Facultad de Veterinaria, Las Palmas, Spanien
Universidade de Sao Paolo, Faculdade de Medicina Veterinaria, Brasilien
Universität Bern, Institut für Parasitologie, Bern, Schweiz
Universität Bern, Institut für Veterinärbakteriologie, Schweiz
Universität Bern, Institut für Veterinärvirologie, Bern, Schweiz
Universität Innsbruck, Institut für Hygiene und Sozialmedizin, Österreich
Universität Lissabon, Faculdade de Medicina Veterinaria, Lissabon, Portugal
Universität Zürich, Institut für Experimentelle Immunologie, Zürich, Schweiz
Universität Zürich, Institut für Neuropathologie, Zürich, Schweiz
Universität Zürich, Institut für Veterinärpathologie, Zürich, Schweiz
University of Bristol, Department of Veterinary Medicine, Bristol, Großbritannien
Université de Liege, Faculté de Médecine véterinaire, Liege, Belgien
University of Illinois, Department of Veterinary Pathology, Urbana-Champaign, USA
University of Gdansk, Biotechnology, Centre Virology and Molecular Biology, Polen
University of Glasgow, Institute of Biomedical and Life Sciences, Glasgow, Großbritannien
University of Guelph, Department of Environmental Biology, Guelph, Ontario, Canada
University of Iowa Medical School, Department of Microbiology, Iowa City, USA
University of Lancaster, Department of Statistics, Großbritannien
University of Otago, Dunedin, Neuseeland
University of Southampton, Medical School, Department of Molecular Microbiology, Großbritannien
University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, Teheran, Iran
University of Wisconsin, Madison, USA
UR, Division of Infectious Diseases, Niederlande
Vet. Agrochem. Res. Ctr., Dept. Virology, Brüssel, Belgien
Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Klinische Immunologie, Wien, Österreich
Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Medizinische Chemie, Wien, Österreich
Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Tierzucht und Genetik, Wien, Österreich
Veterinary Faculty, Ljubljana, Slowenien
Veterinary Laboratories Agency Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey, Großbritannien
Veterinary Research Institute, Brno, Tschechische Republik
Veterinary Research Laboratory, Dublin, Irland
VIDO, Saskatoon, Kanada
Western Fisheries Research Center, Seattle, WA, USA
Witold Stefanski Institute of Parasitology, Warschau, Polen
Zentrallabor für Veterinärmedizin, Virologische Abteilung, Kiew, Ukraine
Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Nationale Fischuntersuchungsstelle, Bern, Schweiz

Vorlesungs- und Hochschultätigkeit

PD Dr. M. Beer, Privatdozent an der Tierärzlichen 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. Praktika: „Grundlagen der Biologie für Biochemiker“, „Immunbiologie für Biologen“. – Prof. Dr. M. Büttner, apl. Professor an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Seminar: „Immunologie bedeutender Virusinfektionen der Nutztiere“; Lehrauftrag an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Vorlesung: „Einführung in die Virologie“, Seminar: „Pathobiologie viraler Infektionskrankheiten“, Seminar: „Virologische und immunologische Methoden“. – PD Dr. F.J. Conraths, Privatdozent an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin. Vorlesung „Angewandte Infektions-epidemiologie“. – Dr. habil. H. Granzow, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Vorlesung: „Allgemeine Virologie, Ultrastruktur und Morphogenesestadien von Viren“. – Dr. habil. V. Kaden, Vorlesung an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin: „Allgemeine und Spezielle Virologie“; Vorlesung an der Universität Rostock: „Impfstoffe“. – Prof. Dr. habil. E. Liebler-Tenorio, apl. Professorin an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Seminare: „Pathologie ausgewählter Darmerkrankungen“, „Pathophysiologie des Darmschleimhautimmunsystems“; 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, Fakultät für Chemie und Pharmazie. Lehre: Grundlagen der molekularen Virologie und Virusvektoren. – PD Dr. I. Moser, Privatdozentin an der Univerität Hohenheim. Vorlesungen: Animal Hygiene in the Tropics and Subtropics. – PD Dr. E. Mundt, Privatdozent an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Vorlesungen zur allgemeinen und speziellen Virologie, Kursleiter eines dreiwöchigen Praktikums: „Vom viralen Gen zum bakteriell exprimierten Protein“. – Prof. Dr. E. Pfaff, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Biologie. Vorlesung/Seminar: „Pathobiologie viraler Infektionskrankheiten: Molekularbiologische und immunologische Grundlagen“; Vorlesung: „Einführung in die Virologie“ und „Spezielle Kapitel aus der Virologie“; Praktikum: „Molekulare Virologie und Immunologie“. – PD Dr. O. Planz, Privatdozent an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Biologie. Vorlesung: „Einführung in die Virologie“ und „Aktuelle Probleme der Virologie“ sowie begleitende Praktika. – PD Dr. P. Reinhold, PhD, Privatdozentin an der FU Berlin. Vorlesungen: „Physiologie der Atmung“, „Pathophysiologie & Respiratorische Funktionsdiagnostik“; Lehrgespräche; Physiologisches Praktikum. - Dr. H.-J. Rziha, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Biologie. Vorlesung: „Einführung in die Virologie“ und „Aktuelle Probleme der Virologie“ sowie begleitende Praktika. - PD Dr. T. Selhorst, Privatdozent an der Universität Bonn, Landwirtschaftliche Fakultät. Seminar: „Leistungsphysiologie und Epidemiologie“; Bonner Biomathematisches Kolloquium. – Prof. Dr. L. Stitz, apl. Professor an der Justus-Liebig-Universität Gießen und an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Biologie. Vorlesung: Einführung in die Virologie und Aktuelle Probleme der Virologie sowie begleitende Praktika. – PD Dr. J. Süss, Privatdozent an der 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)“. – PD Dr. J.P. Teifke, Privatdozent an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Vorlesung: „Allgemeine und Spezielle Pathologie der Haustiere“. – 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“. – Dr. Dr. T.W. Vahlenkamp, Freie Universität Berlin. Vorlesungen im Rahmen Allgemeine und Spezielle Virologie, Immunologie und Immunopathologie; Adjunct Assistant Professor, Dept. of Population Health and Pathobiology, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, USA.

Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Gremien

PD Dr. M. Beer ist Mitglied der EU-Arbeitsgruppe „IBR“ sowie in der Arbeitsgruppe „Molekulare Diagnostik“ des AVID. – PD Dr. F.J. Conraths ist Vorsitzender des Verwaltungsausschusses der COST-Aktion 854 – Dr. P.-J. Enzmann ist Mitglied im Wissenschaftlichen Beirat des Deutschen Fischereiverbandes. - Dr. U. Fischer ist Mitglied in der EAFP, der Nordic Society for Fish Immunology, der German Society for Immunology (Working Group for Veterinary Immunology und Working Group for Developmental and Comparative Immunology) sowie der Tierversuchskommission des Landes Mecklenburg-Vorpommern. – Dr. L. Geue ist stellvertretender Vorsitzender der Tierversuchskommission beim Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Raumordnung des Landes Brandenburg. – 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. habil. 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. – Dr. G. Keil ist Editor der Archives of Virology und Projektgutachter bei der Third World Academy of Science und der United States-Israel Binational Science Foundation. – Dr. H. Köhler ist Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Arbeitskreis Veterinärimmunologie, und Mitglied der Tierschutzkommission nach § 15 TSchG in Thüringen. – Dr. M. Kramer ist Mitglied in der Arbeitsgruppe „Geographic BSE Risk“ der European Food Safety Authority (EFSA), Brüssel, Mitglied der Arbeitsgruppe „Determination of the BSE risk status of Portugal“ der European Food Safety Authority (EFSA), Brüssel. Er hat zeitweilig in der Arbeitsgruppe „Classical swine fever in wild boar“ der Europäischen Kommission, DG SANCO, Brüssel, und in der Arbeitsgruppe „TSE“ der Europäischen Kommission, Brüssel, mitgearbeitet. – 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 Codes Committee on Food Hygiene. – PD Dr. E. Mundt ist Mitglied des Verwaltungsausschusses der COST-Aktion 839 (Immunsuppressive virale Erkrankungen beim Geflügel), Koordinator der Arbeitsgruppe 3 „Vaccination“ der COST-Aktion 839 und Mitglied der Birnavirus-Studiengruppe für die Taxonomie der Family *Birnaviridae*. – Dr. Th. Müller war Mitglied des Steering and Scientific Committee der Rabies in Europe Conference 2004 in Kiew. Darüber hinaus war er Repräsentant des WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research bei der 9th WHO Expert Consultation on Rabies am 04.-08. Oktober 2004 in Genf. – Dr. W. Müller ist Gutachter der AKS Hannover. – Dr. A. Raßbach ist Gutachterin der AKS Hannover. – PD 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 Beirats der Sektion „Pathophysiologie und Aerosolmedizin“ der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DPG), Mitglied der „European Respiratory Society“ (ERS), Mitarbeit in der ERS Task Force „Exhaled biomarkers“. – Prof. Dr. A. Saalmüller ist Mitglied des „Veterinary Immunology Committee (VIC)“ und Vorsitzender der Sektion „Animal homologues“ des „8th International Workshop

on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ und des „Editorial Board“ der Zeitschriften „Veterinary Research“ und „Veterinary Immunology and Immunopathology“. – Dr. K. Sachse ist Vorsitzender des Verwaltungsausschusses der europäischen COST-Aktion 855 „Animal Chlamydioses and the Zoonotic Implications“, Mitglied des Editorial Board der Zeitschrift „Veterinary Research Communications“, Mitglied des Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes of the International Committee of Systematic Bacteriology (ICSB), Leiter des Working Team on Ruminant Mycoplasmas of the International Research Programme on Comparative Mycoplasmology (IRPCM). – Dr. C. Staubach ist Mitglied des Vorstandes der Arbeitsgruppe „Räumliche Statistik“ der deutschen Region der Internationalen Biometrischen Gesellschaft. – Prof. Dr. L. Stitz ist wissenschaftliches Mitglied im Organisationsstab der Stabstelle Ernährungssicherheit des Landes Baden-Württemberg beim Regierungspräsidium Tübingen und Mitglied in der Tierschutzkommission beim Regierungspräsidium Tübingen. – Dr. Dr. T.W. Vahlenkamp ist Vorsitzender des „feline Toolkit Committee“ des Veterinary Immunology Committee (VIC) sowie Mitglied des Editorial Boards der Zeitschrift Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (ASM Journal).

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 Mitglied des Ausschusses für Fische der Bundestierärztekammer. – Dr. habil. V. Kaden ist Mitglied des Ausschusses „Tierseuchen“ in der Landestierärztekammer Mecklenburg-Vorpommern. – Dr. H. Schirrmeier ist Mitglied des Beirates der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft und Vorsitzender des AVID sowie Mitglied im Fachbeirat für Schafzucht Mecklenburg-Vorpommern.

V Veröffentlichungen

1 Veröffentlichungen des Friedrich-Loeffler-Instituts

1.1 Jahresbericht 2003 der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere

1.2 **Rabies Bulletin Europe**, Vol. 27, No. 3 und 4, 2003, Vol. 28, No. 1 und 2, 2004
Herausgeber: Pötzsch, C.J., Institut für Epidemiologie

2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

2.1 Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften

BAREYRE, F.M., KERSCHENSTEINER, M., RAINETEAU, O., METTENLEITER, T.C., WEINMANN, O. und SCHWAB, M.E.: The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats (Nat Neurosci **7**, 269-277, 2004)

BEER, M.: Options for an eradication of BVD/MD: A critical analysis (Tierärztl Umschau **59**, 131-134, 2004)

BEER, M. und METTENLEITER, T.C.: DIVA – die moderne Art der Tierseuchenbekämpfung (Tierärztl Umschau **59**, 551-559, 2004)

BEIER, D., RIEBE, R., BLANKENSTEIN, P., STARICK, E., BONDZIO, A. und MARQUARDT, O.: Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line (J Virol Meth **121**, 239-246, 2004)

BENDFELDT, S., GRUMMER, B., HAAS, L., STAUBACH, C., MOENNIG, V. und LIESS, B.: Unterschiedliche BVD-Seroprävalenzen in vier niedersächsischen Landkreisen und ihre Bedeutung für die Wahl der Kontrollstrategien (Tierärztl Umschau **59**, 499-507, 2004)

BERNDT, A. und METHNER, U.: B cell and macrophage response in chicks after oral administration of Salmonella typhimurium strains (Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**, 235-246, 2004)

BLEICH, A., MAHLER, M., MOST, C., LEITER, E.H., LIEBLER-TENORIO, E., ELSON, C.O., HEDRICH, H.J., SCHLEGELBERGER, B. und SUNDBERG, J.P.: Refined histopathologic scoring system improves power to detect colitis QTL in mice (Mammal Gen **15**, 865-871, 2004)

BRANDES, K., FEND, F., MONECKE, S., TEIFKE, J.P., BREUER, W. und HERMANNS, W.: Comparative Morphologic and Immunohistochemical Investigation of Spontaneously Occurring Thymomas in a Colony of European Hamsters (Vet Pathol **41**, 346-352, 2004)

BRUDERER, U., SWAM, H., HAAS, B., VISSER, N., BROCCHI, E., GRAZIOLI, S., ESTERHUYSEN, J.J., VOSLOO, W., FORSYTH, M., AGGARWAL, N., COX, S., ARMSTRONG, R. und ANDERSON, J.: Differentiating infection from vaccination in

foot-and-mouth disease: evaluation of an ELISA based on recombinant 3ABC (Vet Microbiol **101**, 187-197, 2004)

BULL, M.E., VAHLENKAMP, T.W., DOW, J.L., COLLISSON, E.W., WINSLOW, B.J., TOMPKINS, M.B. und TOMPKINS, W.A.F.: Spontaneous T-cell apoptosis in feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats is blocked by the addition of IL-2 and anti-B7.1 antibodies (Vet Immunol Immunopathol **99**, 25-37, 2004)

BUSCHMANN, A., BIACABE, A.G., ZIEGLER, U., BENCSIK, A., MADEC, J.Y., ERHARDT, G., LUHKEN, G., BARON, T. und GROSCHUP, M.H.: Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests (J Virol Meth **117**, 27-36, 2004)

BUSCHMANN, A., LUHKEN, G., SCHULTZ, J., ERHARDT, G. und GROSCHUP, M.H.: Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrP(ARR/ARR)) (J Gen Virol **85**, 2727-2733, 2004)

BUSCHMANN, A., ZIEGLER, U. und GROSCHUP, M.H.: Standardization of BSE rapid test performances and experiences gathered during the implementation of large-scale testing (Accred Qual Assur **9**, 191-197, 2004)

CONRATHS, F.J., GEUE, L., GROSCHUP, M.H., HÄNEL, I., HENNING, K., KÖHLER, H., MELZER, F., METHNER, U., MOSER, I., MÜLLER, T., RASSBACH, A., SACHSE, K., SCHARES, G., SCHULZ, F., TACKMANN, K., WERNER, O. und METTENLEITER, T.C.: Zoonoses in working and wild animals and their significance in Germany. An overview (Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **47**, 633-646, 2004)

DAMRIYASA, I.M., BAUER, C., EDELHOFER, R., FAILING, K., LIND, P., PETERSEN, E., SCHARES, G., TENTER, A.M., VOLMER, R. und ZAHNER, H.: Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows (Vet Parasitol **126**, 271-286, 2004)

EHRHARDT, C., KARDINAL, C., WURZER, W.J., PLANZ, O., PLESCHKA, S. und LUDWIG, L.: Rac 1 controls activation of interferon regulatory factor-3 in the type I interferon response to viral infections (FEBS Letters **567**, 230-238, 2004)

ERLER, W., MARTIN, G., SACHSE, K., NAUMANN, L., KAHLAU, D., BEER, J., BARTOS, M., NAGY, G., CVETNIC, Z., ZOLNIR-DOVC, M. und PAVLIK, I.: Molecular fingerprinting of Mycobacterium bovis subsp caprae isolates from Central Europe (J Clin Microbiol **42**, 2234-2238, 2004)

ESSBAUER, S., FISCHER, U., BERGMANN, S. und AHNE, W.: Investigations on the ORF 167L of lymphocystis disease virus (Iridoviridae) (Virus Genes **28**, 19-39, 2004)

FAVOREEL, H., METTENLEITER, T.C. und NAUWYNCK, H.J.: Copatching and lipid raft association of different viral glycoproteins expressed on the cell surface of pseudorabies virus-infected cells (J Virol **78**, 5279-5287, 2004)

FERNANDEZ GARCIA, A., HEINDL, P., VOIGT, H., BÜTTNER, M., WIENHOLD, D., BUTZ, P., STÄRKE, J., TAUSCHER, B. und PFAFF, E.: Reduced proteinase K resistance and infectivity of prions after pressure treatment at 60°C (J Gen Virol **85**, 261-264, 2004)

FISCHER, T., BÜTTNER, M. und RZIHA, H.J.: T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (Suid herpesvirus 1)-primed swine indicates efficient immunization (Immunology **101**, 378-387, 2004)

FISCHER, U., DIJKSTRA, J.M., KÖLLNER, B., KIRYU, I., KOPPANG, E.O., HORDVIK, I., SAWAMOTO, Y. und OTOTAKE, M.: The ontogeny of MHC class I expression in rainbow trout (Oncorrhynchus mykiss) (Fish & Shellfish Immunol **18**, 49-60, 2004)

FRICKE, J., VOSS, C., THUMM, M. und MEYERS, G.: Processing of a pestivirus protein by a cellular protease specific for light chain 3 of microtubule-associated proteins (J Virol **78**, 5900-5912, 2004)

FUCHS, W., KLUPP, B.G., GRANZOW, H. und METTENLEITER, T.C.: Essential function of the pseudorabiesvirus UL36 gene product is independent of its interaction with the UL 37 protein (J Virol **78**, 11879-11889, 2004)

FURRER, E., PLANZ, O. und STITZ, L.: Inhibition of Borna Disease Virus-mediated cell fusion by monoclonal antibodies directed against the viral glycoprotein (Intervirology **47**, 108-113, 2004)

GEDVILAITE, A., ZVIRBLIENE, A., STANIULIS, J., SASNAUSKAS, K., KRÜGER, D.H. und Ulrich, R.: Segments of Puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice (Viral Immunol **17**, 51-68, 2004)

GELDMACHER, A., SKRASTINA, D., PETROVSKIS, I., BORISOVA, G., BERRIMAN, J.A., ROSEMAN, A.M., CROWTHER, R.A., FISCHER, J., SHAMIL MUSEMA, Gelderblom, H.R., LUNDKVIST, Å., RENHOFA, R., OSE, V., KRÜGER, D.H., PUMPENS, P. und ULRICH, R.: An amino-terminal segment of hantavirus nucleocapsid protein presented on hepatitis B virus core particles induces a strong and highly cross-reactive antibody response in mice (Virology **323**, 108-119, 2004)

GELDMACHER, A., SCHMALER, M., KRÜGER, D.H. und ULRICH, R.: Yeast-expressed hantavirus Dobrava nucleocapsid protein induces a strong, long-lasting and highly cross-reactive immune response in mice (Viral Immunol **17**, 115-122, 2004)

GRANZOW, H., KLUPP, B.G. und METTENLEITER, T.C.: The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions (J Virol **78**, 1314-1323, 2004)

GÜRTLER, M., METHNER, U., KOBILKE, H. und FEHLHABER, K.: Effect of orally administered egg yolk antibodies on Salmonella enteritidis contamination of hen's eggs (J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51**, 129-134, 2004)

HÄNEL, I., MÜLLER, J., MÜLLER, W. und SCHULZE, E.: Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in Campylobacter jejuni (Vet Microbiol **101**, 75-82, 2004)

HAENEN, O., WAG, K., BERGMANN, S.M. und ARIEL, E.: The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture (Bull Eur Ass Fish Pathol **24**, 293-307, 2004)

HANSEN, F., JELTSCH, F., TACKMANN, K., STAUBACH, C. und THULKE, H.H.: Processes leading to a spatial aggregation of *Echinococcus multilocularis* in its natural intermediate host *Microtus arvalis*. (Int J Parasitol **34**, 37-44, 2004)

HENNING, K.: Coxiellen-Infektionen in Tieren und ihr zoonotisches Potential. (Pneumologie **58**, 284-285, 2004)

HOEGEN, B., SAALMÜLLER, A., ROTTGEN, M., RZIHA, H.J., GELDERMANN, H., REINER, G., PFAFF, E. und BÜTTNER, M.: Interferon-gamma response of PBMC indicates productive pseudorabies virus (PRV) infection in swine (Veterinary Immunol Immunopath **102**, 389-397, 2004)

HÖGER, B., KÖLLNER, B., KOTTERBA, G., VAN DEN HEUVEL, M.R., HITZFELD, B. und DIETRICH, D.R.: Influence of chronic exposure to treated sewage effluent on the distribution of white blood cell populations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Tox Sci **82**(1), 97-105, 2004)

HOTZEL, H., BERNDT, A., MELZER, F. und SACHSE, K.: Occurrence of Chlamydiaceae spp. in a wild boar (Sus scrofa L.) population in Thuringia (Germany) (Vet Microbiol **103**, 121-126, 2004)

HÜBNER, J., KLEIN, D., MÜLLER, E., VAHLENKAMP, T.W. und LANGBEIN, I.: Kombinierte anti-retrovirale Therapie (CART) bei einer felinen Immunschwächevirus (FIV)-infizierten Katze (Kleintierpraxis **49**, 517-524, 2004)

JOSHI, A., VAHLENKAMP, T.W., GARG, H., TOMPKINS, M.B. und TOMPKINS, W.A.F.: Preferential replication of FIV in activated $CD4^{+}25^{+}$ T cells independent of cellular proliferation (Virology **321**, 207-322, 2004)

KADEN, V., LANGE, E., RIEBE R. und LANGE, B.: Classical Swine Fever Virus Strain ‚C'. How Long is it Detectable After Oral Vaccination? (J Vet Med B **51**, 260-262, 2004)

KADEN, V., LANGE, E., POLSTER, U., KLOPFLEISCH, R. und TEIFKE, J.P.: Studies on the virulence of two field isolates of the classical swine fever virus genotype 2.3 Rostock in wild boars of different age groups (J Vet Med B **51**, 202-208, 2004)

KADEN, V. und LANGE, E.: Development of maternal antibodies after oral vaccination of young female wild boar against classical swine fever (Vet Microbiol **103**, 115-119, 2004)

KADEN, V., LANGE, E., RIEBE, R. und LANGE, B.: Classical swine fever virus strain „C". How long is it detectable after oral vaccination? (J Vet Med B **51**, 260-262, 2004)

KADEN, V., LANGE, E. und STEYER, H.: Does multiple oral vaccination of wild boar against classical swine fever (CSF) have a positive influence on the immunity? (Dtsch tierärztl Wschr **111**, 63-67, 2004)

KEIL, G.M., HÖHLE, C., GIESOW, K. und KÖNIG, P.: Engineering glycoprotein B of Bovine Herpesvirus 1 to function as transporter for secreted proteins: a new protein expression approach (J Virol **79**, 791-799, 2004)

KENKLIES, S., MAKOSCHEY, B., LIEBLER-TENORIO, E. und GREISER-WILKE, I.: Occurrence of bovine viral diarrhea virus species 2 (BVDV2) in three dairy herds in Lower Saxony: virology and serology (Tierärztl Umschau **59**, 135-139, 2004)

KLEMPA, B., SCHÜTT, M., AUSTE, B., ULRICH, R., MEISEL, H. und KRÜGER, D.H.: First molecular identification of human Dobrava virus infection in Central Europe (J Clin Microbiol **42**, 1322-1325, 2004)

KLOPFLEISCH, R., POLSTER, U., KLINGLER, K. und TEIFKE, J.P.: Severe but „silent" cholangiolithiasis in a cattle. A case report (Tierärztl Praxis Ausgabe Großtiere Nutztiere **23**, 13-17, 2004)

KLOPFLEISCH, R., TEIFKE, J.P., FUCHS, W., KOPP, M., KLUPP, B.G. und METTENLEITER, T.C.: Influence of tegument proteins of pseudorabies virus on neuroinvasion and transneuronal spread in the nervous system of adult mice after intranasal inoculation (J Virol **78**, 2956-2966, 2004)

KLUPP, B.G., HENGARTNER, C.J., METTENLEITER, T.C. und ENQUIST, L.W.: Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome (J Virol **78**, 424-440, 2004)

KLUPP, B.G., GRANZOW, H., FUCHS, W., MUNDT, E. und METTENLEITER, T.C.: Pseudorabies virus UL3 gene codes for a nuclear protein which is dispensable for viral replication (J Virol **78**, 464-472, 2004)

KÖLLNER, B., FISCHER, U., ROMBOUT, J.H.W.M., TAVERNE-THIELE, J.J. und HANSEN, J.D.: Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR (Dev Comp Immunol **28**, 1049-1062, 2004)

KÖNIG, P., GIESOW, K., SCHULDT, K., BUCHHOLZ, U.J. und KEIL, G.M.: 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, 2004)

KÖRBEL, S., BITTORF, T., SIEGL, E. und KÖLLNER, B.: Recombinant human erythropoietin induces proliferation and Ca2+-influx in specific leukocyte subpopulations of rainbow trout (Oncorhynchus myiss) blood and head kidney cells (J Comp Physiol B **174**, 121-128, 2004)

KOPP, M., GRANZOW, H., FUCHS, W., KLUPP, B. und METTENLEITER, T.C.: Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment (J Virol **78**, 3024-3034, 2004)

KOSLOWSKY, S., STAUBACH, C., KRAMER, M., und WIELER, L. H.: Risikoabschätzung zur Einschleppung der Bluetongue Disaese nach Deutschland mit Hilfe eines

Geographischen Informationssystems (GIS). (Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **117**, 214-225, 2004)

KOSTKA, M., GROSCHUP, M., KALETA, E.F. und SCHRÖDER, J.: Failure to induce formation of proteinase K resistant fibrils in pigeons through experimental infection with paramyxovirus type 1 (Dtsch tierärztl Wschr **104**, 174-175, 2004)

KRAMPS, J.A., BANKS, M., BEER, M., KERKHOFS, P., PERRIN, M., WELLENBERG, G.J. und OIRSCHOT, J.T.V.: Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe (Vet Microbiol **102**, 169-181, 2004)

KRAUS, A.A., RAFTERY, M.J., GIESE, T., ULRICH, R., ZAWATZKY, R., HIPPENSTIEL, S., SUTTORP, N., KRÜGER, D.H. und SCHÖNRICH, G.: Differential antiviral response of endothelial cells after infection with pathogenic and nonpathogenic hantaviruses (J Virol **78**, 6143-6150, 2004)

KUCZIUS, T., BUSCHMANN, A., ZHANG, W., KARCH, H., BECKER, K., PETERS, G. und GROSCHUP, M.H.: Cellular prion protein acquires resistance to proteolytic degradation following copper ion binding (Biol Chem **385**, 739-747, 2004)

LEISTER, D. und MARQUARDT, O.: Production of full-length cDNA from a picornaviral genome by RT-PCR (Trends Genet **12**, 2004)

LENTZSCH, P., RIEKSNEUWOHNER, B., WIELER, L.H., HOTZEL, H. und MOSER, I.: High-resolution genotyping of Campylobacter upsaliensis strains originating from three continents (J Clin Microbiol **42**, 3441-3448, 2004)

LIEBLER-TENORIO, E.M., RIDPATH, J.E. und NEILL, J.D.: Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus (J Vet Diagn Invest **16**, 388-396, 2004)

LIMANSKII, A.P., GEUE, L., LIMANSKAIA, O.I. und BEIER, D.: Typing of cattle leukemia virus circulating in the Ukraine (Vopr Virusol **49**, 39-44, 2004)

LUDWIG, S., REINHARD, J., WOLFF, T., PLANZ, O. und PLESCHKA, S.: MEK-inhibition impairs virus propagation without emergence of resistant variants (FEBS Letters **561**, 37-41, 2004)

LUDWIG, S., WOLFF, T., EHRHARDT, C., WURZER, W., REINHARDT, J., PLANZ, O. und PLESCHKA, S.: MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants (FEBS Letters **561**, 37-43, 2004)

LÜHKEN, G., BUSCHMANN, A., GROSCHUP, M.H. und ERHARDT, G.: Prion protein allele A136H154Q171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep (Arch Virol **149**, 1571-1580, 2004)

MAKOSCHEY, B. und BEER, M.: Assessment of the risk of transmission of vaccine viruses by using insufficiently cleaned infection devices (Vet Rec **30**, 563-564, 2004)

METHNER, U., BARROW, P.A., GREGOROVA, D. und RYCHLIK, I.: Intestinal colonisation-inhibition and virulence of Salmonella phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens (Vet Microbiol **98**, 37-43, 2004)

METTENLEITER, T.C.: Budding events in herpesvirus morphogenesis (Virus Res **106**, 167-180, 2004)

MEURENS, F., KEIL, G., MUYLKENS, B., GOGEV, S., SCHYNTS, F., NEGRO, S., WIGGERS, L. und THIRY, E.: Interspecific recombination between two ruminant alphaherpesvirus, bovine herpesvirus 1 and 5 (J Virol **78**, 9828-9936, 2004)

MEURENS, F., SCHYNTS, F., KEIL, G.M., MULYLKENS, B., VANDERPLASSCHEN, A., GALLEGO, P. und THIRY, E.: Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1 (J Virol **78**, 3872-3879, 2004)

MICHEL, R., STEINERT, M., ZOLLER, L., HAURODER, B. und HENNING, K.: Free-living amoebae may serve as hosts for the Chlamydia-like bacterium Waddlia chondrophila isolated from an aborted bovine foetus (Acta Protozoologica **43**, 37-42, 2004)

MOUDJOU, M., TREGUER, E., REZAEI, H., SABUNCU, E., NEUENDORF, E., GROSCHUP, M.H., GROSCLAUDE, J. und LAUDE, H.: Glycan-Controlled Epitopes of Prion Protein Include a Major Determinant of Susceptibility to Sheep Scrapie (J Virol **78**, 9270-9276, 2004)

MÜLLER, T., COX, J., PETER, W., SCHÄFER, R., JOHNSON, N., McELHINNEY, L.M., GEUE, L., TJORNEHOJ, K. und FOOKS, A.R.: Spill-over of European Bat Lyssavirus Type 1 into a Stone Marten (Martes foina) in Germany (J Vet Med B **51**, 49-54, 2004)

NEUENDORF, E., WEBER, A., SAALMÜLLER, A., SCHATZL, H.M., REIFENBERG, K., PFAFF, E. und GROSCHUP, M.H.: Glycosylation Deficiency at Either One of the Two Glycan Attachment Sites of Cellular Prion Protein Preserves Susceptibility of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie Infections (J Biol Chem **279**, 53306-53316, 2004)

OLSCHLAGER, V., PLESCHKA, S., FISCHER, T., RZIHA, H.J., WURZER, W., STITZ, L., RAPP, U.R., LUDWIG, S. und PLANZ, O.: Lung-specific expression of active Raf kinase results in increased mortality of influenza A virus-infected mice (Oncogene **23**, 6639-6646, 2004)

RASCHE, F.M., UHEL, B., ULRICH, R., KRÜGER, D.H., KARGES, W., CZOCK, D., HAMPL, W., KELLER, F., MEISEL, H. und VON MÜLLER, L.: Thrombocytopenia is a predictor for acute renal failure in Puumala hantavirus infections (Emerg. Infect. Dis. **10**, 1420-1425, 2004)

RAŽANSKIENĖ, A., SCHMIDT, J., GELDMACHER, A., RITZI, A., NIEDRIG, M., LUNDKVIST, Å., KRÜGER, D.H., MEISEL, H., SASNAUSKAS, K. und ULRICH, R.: High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (J. Biotechnol. **111**, 319-333, 2004)

REIMANN, I., DEPNER, K., TRAPP, S. und BEER, M.: An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus (Virology **322**, 143-157, 2004)

REISSBRODT, R., RASSBACH, A., BURGHARDT, B., RIENACKER, I., MIETKE, H., SCHLEIF, J., TSCHAPE, H., LYTE, M. und WILLIAMS, J.: Assessment of a new selective chromogenic Bacillus cereus Group pating medium and use of enterobacterial autoinducer of growth for cultural identification of Bacillus species (J Clin Microbiol **42**, 3795-3798, 2004)

SACHSE, K., GROSSMANN, E., BERNDT, A., SCHUTT, C., HENNING, K., THEEGARTEN, D., ANHENN, O. und REINHOLD, P.: Respiratory chlamydial infection based on experimental aerosol challenge of pigs with Chlamydia suis (Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**, 7-23, 2004)

SACHSE, K.: Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens (Mol Biotechnol **26**, 61-79, 2004)

SANDER, P., HAMANN, H., PFEIFFER, I., WERNHEUER, W., BRENIG, B., GROSCHUP, M.H., ZIEGLER, U., DISTL, O. und LEEB, T.: Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds (Neurogenetics **5**, 19-25, 2004)

SAUERWEIN, H., HEINTGES, U., HENNIES, A., SELHORST, T. und DAXENBERGER, A.: Growth hormone induced alterations of leptin serum concentrations in dairy cows as measured by a novel enzyme immunoassay. (Livestock Prod. Sci. **87**, 189-195, 2004)

SCHARES, G., BÄRWALD, A., STAUBACH, C., ZILLER, M., KLÖß, D., SCHRÖDER, R., LABOHM, R., DRÄGER, K., FASEN, W., HESS, R.G. und CONRATHS, F.J.: Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. (Parasitology **129**, 301-309, 2004)

SCHARES, G., BÄRWALD, A., STAUBACH, C., ZILLER, M., KLÖSS, D., WURM, R., RAUSER, M., LABOHM, R., DRÄGER, K., FASEN, W., HESS, R.G. und CONRATHS, F.J.: Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. (Int J Parasitol **33**, 1631-1634, 2004)

SCHARES, G., BÄRWALD, A., STAUBACH, C., WURM, R., RAUSER, M., CONRATHS, F.J. und Schroeder, C.: Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. (Vet Parasitol **120**, 55-63, 2004)

SCHIRRMEIER, H., STREBELOW, G., DEPNER, K.R., HOFFMANN, B. und BEER, M.: Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species (J Gen Virol **85**, 3647-3652, 2004)

SCHRADER, C. und SÜSS, J.: Molecular epidemiology of porcine H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1982 and 2001 (Intervirology **47**, 72-77, 2004)

SCHUSTER, P., BONIN, J., STAUBACH, C. und NITSCHKE, B.: Zur Verbreitung opisthorchiider Leberegel bei Rotfüchsen (Vulpes vulpes) in Westbrandenburg (Berl Münch Tierärztl Wschr **113**, 407-411, 2004)

SCHÜTT, M., MEISEL, H., KRÜGER, D.H., ULRICH, R., DALHOFF, K. und DODT, C.: Life-threatening Dobrava hantavirus infection with unusually extended pulmonary involvement (Clin Nephrol **62**, 54-57, 2004)

SIEGL, E., KÖRBEL, S., BITTORF, T. und KÖLLNER, B.: Recombinant human Erythorpoietin induces proliferation and Ca^{2+}-influx in specific leukocyte subpopulations of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) blood and head kidney cells (J Comp Physiol (B), **174**(2), 121-128, 2004)

SNOW, M., BARJA, J., COLQUHOUN, D., CUNNINGHAM, C., DEVOLD, M., DOPAZO, C., EINER-JENSEN, K., EVENDEN, A., ENZMANN, P., GILPIN, M., GRAY, T., NYLUND, A., PALEY, R., STONE, D. und THIERY, R.: Development of a European resource on the origins of pathogens of aquaculture: The Europa Project (Bull Eur Ass Fish Pathol **24**, 54-57, 2004)

SPEHNER, D., DE CARLO, S., DRILLIEN, R., WEILAND, F., MILDNER, K., HANAU, D. und RZIHA, H.J.: Appearance of the bona fide spiral tubule of Orf virus is dependent on an intact 10-kilodalton viral protein (J Virol **78**, 8085-8093, 2004)

STOKSTAD, M., COLLINS, M., SORBY, R., BARBONI, P., MEYERS, G., LOKEN, T. und BROWNLIE, J.: The role of the defective interfering particle DI9c in mucosal disease in cattle (Arch Virol **149**, 571-582, 2004)

STRAUB, O.C.: Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge (Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**, 1-5, 2004)

TEUFFERT, J., PÖTZSCH, C., KROSCHEWSKI, K., SCHLÜTER, H. and SCHIELKE, G.: Stand der Bovinen Herpesvirus Typ 1-Sanierung und Probleme in der Berichterstattung (Tierärztl Umschau **59**, 162-168, 2004)

THEEGARTEN, D., ANHENN, O., HOTZEL, H., WAGNER, M., MARRA, A., STAMATIS, G., MOGILEVSKI, G. und SACHSE, K.: A comparative ultrastructural and molecular biological study on Chlamydia psittaci infection in alpha-1 antitrypsin deficiency and non-alpha-1 antitrypsin deficiency emphysema versus lung tissue of patients with hamartochondroma (BMC Infect Dis **4**, 38, 2004)

THIRY, E., MEURENS, F., MUYLLKENS, B, McVOY, M., GOGEV, S., THIRY, J., VANDERPLASSCHEN, A., EPSTEIN, A., KEIL, G.M. und SCHYNTS, F.: Recombination in alphaherpesviruses (Rev Med Virol, Epub, Nov. 2004)

THULKE, H.H., SELHORST, T., MÜLLER, T., BREITENMOSER, U., MÜLLER, U., Wyszomirski, T. und TINLINEN, R.:Assessing anti-rabies baiting - what happens on the ground? (BMC Infectious Diseases **4**, 9, 2004)

THURING, C.M.A., ERKENS, J.H.F., JACOBS, J.G., BOSSERS, A., VAN KEULEN, L.J.M., GARSSEN, G.J., VAN ZIJDERVELD, F.G., RYDER, S.J., GROSCHUP, M.H., SWEENEY, T. und LANGEVELD, J.P.M.: Discrimination between Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy in Sheep by Molecular Size, Immunoreactivity, and Glycoprofile of Prion Protein (J Clin Microbiol **42**, 972-980, 2004)

TIKKANEN, M.K., MCINNES, C., MERCER, A.A., BÜTTNER, M., TUIMALA, J., HIRVELÄ-KOSKI, V., NEUVONEN, E. und HOUVILAINEN, A.: Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (Rangifer tarandus tarandus) are closely related to bovine pseudocowpox virus (J Gen Virol **85**, 1413-1418, 2004)

TOUSSAINT, J.F., RZIHA, H.J., BAUER, B., LETELLIER, C. and KERKHOFS, P.: Effects of hypervaccination with bovine herpesvirus type 1 gE-deleted marker vaccines on the serological response and virological status of calves challenged with wild-type virus (Vet Rec **155**, 553-558, 2004)

VAHLENKAMP, T.: Virus-host interactions in feline immunodeficiency virus infected cats (Tierärztl Umschau **59**, 566-576, 2004)

VAHLENKAMP, T.W., BULL, M.E., DOW, J.L., COLLISSON, E.W., WINSLOW, B.J., TOMPKINS, W.A.F. und TOMPKINS, M.B.: $B7^+$ and $CTLA4^+$ T cells engaged in T-T cell interactions that mediate apoptosis: A model for lentivirus induced T cell depletion (Vet Immunol Immunopathol **98**, 203-214, 2004)

VAHLENKAMP, T.W., TOMPKINS, M.B. and TOMPKINS, W.A.F.: Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive $CD4^+25^+$ T regulatory cells (J Immunol **172**, 4752-4761, 2004)

VAN MAANEN, C., WOUDA, W., SCHARES,G., VON BLUMRODER, D., CONRATHS, F.J., NORTON, R., WILLIAMS, D.J.L., ESTEBAN-REDONDO, I., MATTSSON, J.G., BJÖRKMAN, C., FERNANDEZ-GARCIA, A., ORTEGA-MORA, L.M., MÜLLER, N., SAGER, H. und HEMPHILL, A.: An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. (Vet Parasitol, **126**, 351-364, 2004)

VOIGT, J., STEVANOVIC, S., SCHIRLE, M., FAUSEL, M., MAIER, J., ADAM, K.H. and MARQUARDT, O.: A 14-3-3 protein of Chlamydomonas reinhardtii associated with the endoplasmic reticulum: nucleotide sequence of the cDNA and the corresponding gene and derived amino acid sequence (Biochim Biophys Acta **1679**, 180-194, 2004)

VON BLUMRÖDER; D., SCHARES, G., NORTON, R., WILLIAMS, D.J.L., ESTEBAN-REDONDO, I., WRIGHT, S., BJÖRKMAN, C., FRÖSSLING, J., RISCO-CASTILLO, V., Fernández-GARCÍA, A., ORTEGA-MORA, L.M., SAGER, H., HEMPHILL, A., VAN MAANEN, C., WOUDA, W. und CONRATHS, F.J.: Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. (Vet Parasitol **120**, 11-22, 2004)

VON EINEM, C., GORBALENYA, A.E., SCHIRRMEIER, H., BEHRENS, S.E., LETZEL, T. und MUNDT, E.: VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase (J Gen Virol **85**, 2221-2229, 2004)

VON FREYBURG, M., EGE, A., SAALMÜLLER, A. und MEYERS, G.: Comparison of the effects of RNase-negative and wild-type classical swine fever virus on peripheral blood cells of infected pigs (J Gen Virol **85**, 1899-1908, 2004)

VONLAUFEN, N., GUETG, N., NAGULESWARAN, A., MÜLLER, N., BJÖRKMAN, C., SCHARES, G., VON BLUMRÖDER, D., ELLIS, J. und HEMPHILL A. In vitro

induction and purification of *Neospora caninum* bradyzoites from Vero cells reveals differential antigen expression and localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. (Infect Immun **72**, 576-583, 2004)

VOS, A., MÜLLER, T., COX, J., NEUBERT, L. und FOOKS, A.R. : Susceptibility of Ferrets (Mustela putorius furo) to Experimentally Induced Rabies with European Bat Lyssaviruses (EBLV) (J Vet Med B **51**, 55-60, 2004)

VOS, A., MÜLLER, T., NEUBERT, L., ZURBRIGGEN, A., BOTTERON, C., POHLE, D., SCHOON, H., HAAS, L. und JACKSON, A.C.: Rabies in Red Foxes (Vulpes vulpes) Experimentally Infected with European Bat Lyssavirus Type 1 (J Vet Med B **51**, 327-332, 2004)

VOS, A., SUTOR, A., SELHORST, T., SCHWARZ, S., PÖTZSCH, C., STAUBACH, C. und MÜLLER, T.: The spatial and temporal disappearance of different oral rabies vaccine baits (Berl Münch Tierärztl Wschr **117**, 360-366, 2004)

WURZER, W.J., EHRHARDT, C., PLESCHKA, S., BERBERICH-SIEBELT, F., WOLFF, T., WALCZAK, H., PLANZ, O. und LUDWIG, S.: NF-(kappa)B-dependent Induction of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) and Fas/FasL Is Crucial for Efficient Influenza Virus Propagation (J Biol Chem **279**, 30391-30937, 2004)

YAN, Z., STITZ, L., HEEG, P., PFAFF, E. and ROTH, K.: Infectivity of prion protein bound to stainless steel wires: a model for testing decontamination procedures for transmissible spongiform encephalopathies (Infect Contr Hosp Epidemiol **25**, 280-283, 2004)

2.2 Buchbeiträge, Kongressbeiträge und nicht referierte Veröffentlichungen

BEER, M.: Neue Entwicklungen bei der BVDV-Diagnostik und –Immunisierung (AGEV-Tagung, Oberschleißheim, 30 März 2004, Tagungsbericht)

BEER, M. und TEUFFERT, J.: Bovine Herpesvirus Typ 1-Infektion (BHV1) (Tiergesundheitsjahrbuch 2003, 4. Jahrgang, Juli 2004)

BERGMANN, S., KADEN, V. und BIFFAR, A.: Koi-Herpesvirus – Gegenwärtiger Kenntnisstand und wie weiter? (Fischer und Teichwirt **55**, 747, 2004)

CONRATHS, F. J., GEUE, L., GROSCHUP, M. H., HÄNEL, I., HENNING, K., KÖHLER, H., MELZER, F., METHNER, U., MOSER, I., MÜLLER, T., RAßBACH, A, SACHSE, K., SCHARES, G., SCHULZ, F., TACKMANN, K., WERNER, O. und Mettenleiter, T. C.: Zoonosen der Nutz- und Wildtiere und ihre Bedeutung in Deutschland (Bundesgesundheitsblatt **7**, 633-646, 2004)

DELMAS, B., KIBENGE, F.S.B., LEONG, J.C., MUNDT, E., VAKHARIA, V.N. und WU, J.L.: Birnaviridae. In: Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger und L.A. Ball, eds.), 561-569, Elsevier/Academic Press, London (2004)

DENZIN, N., SCHLIEPHAKE, A. und STAUBACH, C.: Zum Vorkommen von Echinococcus multilocularis bei Rotfüchsen in Sachsen-Anhalt: Anwendung moderner Verfahren der

räumlichen Epidemiologie und Identifizierung von Gebieten mit erhöhtem Risiko (Amtstierärztl Dienst u Lebensmittelkontrolle **11**, 105-111, 2004)

DEPNER, K.: Nationales Referenzlaboratorium für klassische Schweinepest, Insel Riems (Forschungsreport Ernährung, Landwirtschaft, Forsten **50**, 2004)

DURR, P.A., TAIT, N., and STAUBACH, C.: Resources guide : Software, Data and GisVet Web. In Durr, P.A., Gatrell, A.C. [Ed.] GIS and Spatial Analysis in Veterinary Science. (CABI Publishing, Wallingford, pp. 285-298, 2004).

FICHTNER, D., BERGMANN, S.M., ENZMANN, P.-J., GRANZOW, H. und DAUBER, M.: Neues aus dem Nationalen Referenzlabor für Fischkrankheiten (X. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP) zum Thema Fischkrankheiten vom 8.-10. September 2004 in Stralsund, Tagungsband)

FICHTNER, D., BERGMANN, S.M., ENZMANN, P.-J., GRANZOW, H. und DAUBER, M.: Stand der Diagnose und Bekämpfung von Fischkrankheiten in Deutschland (Tagung DVG-Fachgruppe Tierseuchen am 14./15.09.2004 in Hannover, Tagungsband)

FICHTNER D., ENZMANN P.-J. und BERGMANN S.M.: Krankheiten nach dem „Aquatic Animal Health Code" des OIE: Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) und Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) (Tiergesundheitsjahresbericht 2003. Hrsg.: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft und Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, **4. Jg.** 92-127, 2004)

FICHTNER, D., BERGMANN, S.M. und ENZMANN, P.-J.: Survey and Diagnosis of VHS and IHN in Germany-Year 2003 data. In E. Ariel: Survey of the NRLs 2003 (8^{th} Annual Meeting of National Reference Laboratories for Fish Diseases, Part 2., 2004)

FISCHER, U., TOMONORI, S., UTKE, K., KÖLLNER, B., STACHOWSKI, A. und DIJKSTRA, J.M.: First evidence for CD4 in rainbow trout (Abstracts of the Joint Annual Meeting of the Greman and Dutch Society for Immunology, Maastricht, Oct. 20^{th}-23^{th}, Immunobiology **209**, No. 4-6, 478, 2004)

FISCHER, U., UTKE, K., KÖLLNER, B., DIJKSTRA, J.M., SCHÜTZE, H., OTOTAKE, M. und NAKANISHI, T.: Zellvermittelte Zytotoxizität bei Fischen (X. Gemeinschaftstagung der Deutschen und Österreichischen Sektion der EAFP zum Thema Fischkrankheiten, 8.-10. September 2004 in Stralsund, Tagungsband)

GLOBIG, A., WERNER, O. und STARICK, E.: Untersuchung von Wildvögeln auf aviäre Influenzaviren (AVID, Kloster Banz, 15.-17. September 2004, Tagungsband)

GORBALENYA, A.E. und MUNDT, E.: Birnavirus VP4 processing endopeptidases. In: Handbook of proteolytical enzymes, 2^{nd} Edition, (A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner, eds.), 1995-1998, Academic Press (2004)

HAAS, B.: Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus in Milk (Bulletin of the International Dairy Foundation. 392, 77-83, 2004, Tagungsband)

HAAS, B.: Prediction of protection by FMD vaccines on the basis of LPBE results. (In: Session

of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Chania, 11-15 October 2004, Tagungsband)

HAAS, B.: Development of Improved Methods for the Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease (In: Workshop on EU funded research in foot and mouth disease and classical swine fever, Brussels, 22-23 January 2004)

KADEN, V.: Diagnosis of CSF in wild boar: methods / procedures applied in Germany (Report on Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories, Grange, Ireland, 10-11 May 2004, pp. 30-31, 2004)

KADEN, V., POLSTER, U., HELLER, P., KLÄHN, J., HILLE, S., BARTSCH, M., ROOST, H., BLUM, H., HELMS, E. und WITTIG, M.: Dreifachimpfung ohne Nadel (Tierzucht **45**, 60-62, 2004)

KADEN, V., RENNER, R., HÄNEL, A., UHLARZ, W., RÜTER, M., LANGE, E. und GOSSGER, K.: Immunisierung von Schwarzwild gegen die Schweinepest – Schluckimpfung ist süß (Wild und Hund **15**, 32-35, 2004)

KLOPFLEISCH, R., TEIFKE, J.P. und METTENLEITER, T.C.: Tegument proteins of pseudorabies virus influence neuroinvasion and transneuronal spread in the nervous system of adult mice (Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen 17.03.04 bis 20.03.04, Tagungsband)

KLOPFLEISCH, R., TEIFKE, J.P. und METTENLEITER, T.C.: 5 „Kasuistische Beiträge“ à 15 min: TGEV, ILT, ENTV, Salzdrüsenentzündung, Tonsillenkarzinom Polarwolf (12. Tagung des Arbeitskreises Diagnostische Pathologie, Erbenhausen 13.05.04 bis 15.05.04, Tagungsband)

KÖLLNER, B., UTKE, K., STACHOWSKI, A., HORDVIK, I., DIJKSTRA, H. und FISCHER, U.: Antigen dependent activation of adaptive immune response without expression of CD4 and CD8 in fish? (Abstracts of the Joint Annual Meeting of the Greman and Dutch Society for Immunology, Maastricht, Oct. 20th-23th, Immunobiology **209**, No. 4-6, 480, 2004)

KÖLLNER, B., WASSERRAB, B., FISCHER, U., KOTTERBA, G. und van den HEUVEL, M.: How can toxic effects of pollution of the aquatic environment on the immunocompetence of fishes be detected? - A discussion on the relevance of the biomarkers philosophy. In: Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment (Ed. by Dietrich, D. R., Webb, S. F. & Petry, T., 143-164, 2004)

KÖNIG, P., LANGE, E., KADEN, V., REIMANN, I. und BEER, M.: Oral vaccination with a chimeric pestivirus protects wild boar from lethal classical swine fever challenge infection (Annual Meeting of the “Gesellschaft für Virologie” joint Meeting with “Societa Italiana di Virologia”, Tübingen, March 17-20, 2004, Tagungsband)

KOTTERBA, G., BERGMANN, S.M, FICHTNER, D. und KÖLLNER, B.: Untersuchung zur Wechselwirkung artifizieller Mischinfektionen mit *Aeromonas salmonicida salmonicida (A.s.s.)* und dem Virus der *Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV)* der Regenbogenforelle *(Oncorhynchus mykiss)* (X. Gemeinschaftstagung der Deutschen und

Österreichischen und Schweizer Sektion der EAFP zum Thema Fischkrankheiten“ vom 8.-10.09.2004 in Stralsund, Tagungsband)

KOTTERBA, P., KOTTERBA, G. und TAUTENHAHN, A.: Untersuchung der immunstimulierenden Wirkung einer Chlorella vulgaris – Extraktzusatzfütterung auf Forellen (X. Gemeinschaftstagung der Deutschen und Österreichischen und Schweizer Sektion der EAFP zum Thema Fischkrankheiten“ vom 8.-10.09.2004 in Stralsund, Tagungsband)

KRAMER, M.: Gegenwärtige Strategien der Tierseuchenbekämpfung in der EU und mögliche Varianten. (Tagungsbericht über die Tagung der DVG-Fachgruppen „Tierschutzrecht“ und „Tierzucht, Erbpathologie und Haustiergenetik“ in Verbindung mit der Fachhochschule Nürtingen und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz, Nürtingen, 19.- 20. Februar 2004, S. 74 – 81)

KROSCHEWSKI, K. und BEIER, D.: Enzootische Leukose der Rinder (Tiergesundheitsjahresbericht 2003, 53-57)

METTENLEITER, T.C.: Herpesviren – vom Genom zur Erkrankung (Jahrbuch 2003 der Akademie der Naturforscher Leopoldina)

MÜLLER, TH., WERNER, O., STARICK, E. et al.: A virological and serological survey in migrating waders and waterfowl in Germany (6th Conference of the European Wildlife Disease Association, Uppsala / Sweden, 8-12 September 2004, p.49-50)

NÜCHTER, H., SACHSE, K. und KALETA, E.F.: Die Aviäre Chlamydiose und ihre Bekämpfung in der Europäischen Union (Teil 1 und Teil 2) (Amtstierärztl Dienst u Lebensmittelkontrolle **11**, 97 (189) – 102 (194), 2004

PÖTZSCH, C.J.: Geflügelpestbekämpfung in Südostasien. Ein Einsatz in China und der Mongolei (Deutsches Tierärzteblatt **52**, 804-810, 2004)

PÖTZSCH, C.J.: Rabies surveillance in Europe (Rabies Bulletin Europe, **28** , 6-10, 2004)

SCHARES, G.: Grundfutter vor Verschmutzung schützen. (Hessenbauer **19**, 26-27, 2004)

SCHARES, G.: Die Krankheit kommt auf leisen Pfoten. (BW agrar **20**, 2004).

SCHIRRMEIER, H., HOFFMANN, B., GLOBIG, A., MÜLLER, T. und WERNER, O.: West Nile Virus-Surveillance bei Wildvögeln. Erste Ergebnisse und Risikoabschätzung. Referatesammlung des 66. Geflügelfachgesprächs, ReS. 35-43)

STACHOWSKI, A., HORDVIK, I., KOPPANG, E. und KÖLLNER, B.: Characterization of anti-salmon MHC class II monoclonal antibodies (Abstracts of the Joint Annual Meeting of the Greman and Dutch Society for Immunology, Maastricht, Oct. 20th-23th, Immunobiology **209**, No. 4-6, 481, 2004)

STARICK, E.: RT-PCR-Methoden für die Differentialdiagnostik AIV, PMV-1 (AVID, Kloster Banz, 15.-17. September 2004, Tagungsband)

STAUBACH, C., SCHMID, V., KNORR-HELD, L. and ZILLER, M.: Bayesian modelling of

space-time variation in contagious wildlife diseases (*Echinococcus multilocularis* data). (Biometrical Journal **46** Suppl., 29-30, 2004)

STAUBACH, C., SCHMID, V., KNORR-HELD, L. and ZILLER, M., 2004. Bayesian modelling of space-time variation in contagious wildlife diseases (CSF in wild boar data). (Proceedings of the GISVET 2004 conference on the applications of GIS and spatial analysis to veterinary science. Guelph, Canada, 23-25.06.2004, pp. 87-90)

STAUBACH, C., SCHMID, V., KNORR-HELD, L. und ZILLER, M.: Bayesian modelling of space-time variation in contagious wildlife diseases (CSF in wild boar data). Proceedings of the GISVET 2004 conference on the applications of GIS and spatial analysis to veterinary science. Guelph, Canada, 23-25.06.2004, 87-90)

TACKMANN, K.: Wird der Marderhund zur Gefahr? (Landwirtschaftliches Wochenblatt Westfalen-Lippe, Nr. 36, 53–54, 2004)

TACKMANN, K., GORETZKI, J. und CONRATHS, F.J.: Das Neozoon Marderhund als neue Endwirtpopulation für *Echinococcus multilocularis* in Ostdeutschland – ein Risiko? (Schriftenreihe des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Reihe A: Angewandte Wissenschaft. Heft 498: Bedrohung der bilogischen Vielfalt durch invasive gebietsfremde Arten – Erfassung, Monitoring und Risikoanalyse. S. 176 – 181. Landwirtschaftsverlag GmbH Münster Hiltrup. ISBN 3-7843-0498-2, 2004)

TEUFFERT, J.: Viehbestandsentwicklung bei landwirtschaftlichen Nutztieren Deutschlands und aktuelle Tierbestände bei Rindern, Schweinen und Schafen in den Bundesländern (Tiergesundheitsjahrbuch 2003, 4. Jahrgang, Juli 2004)

TEUFFERT, J., DEPNER, K.R. und KADEN, V.: Klassische Schweinepest (Tiergesundheitsjahresbericht 2003, **4**, 18-25, 2004)

TEUFFERT, J., PÖTZSCH, C., KROSCHEWSKI, K., SCHLÜTER, H. und SCHIELKE, G.: Stand der Bovinen Herpesvirus Typ 1-Sanierung und Probleme in der Berichterstattung (Tierärztliche Umschau **59**, 162-168, 2004)

ULRICH, R., ESSBAUER, S., SCHMIDT, J., FRIEDRICH, R., CONRATHS, F.J., DOBLER, G., WÖLFEL, R., PFEFFER, M., KÖHLER, M., KOCH, J. und HAUTMANN, W.: Untersuchungen zum gehäuften Auftreten von klinisch apparenten humanen Hantavirusinfektionen in östlichen Landkreisen Niederbayerns im Sommer/Herbst 2004 (FLI-Info **2**, 13-19, 2004)

ULRICH, R., MEISEL, H., SCHÜTT, M., SCHMIDT, J., KUNZ , A., KLEMPA, B., NIEDRIG, M., KIMMIG, P., PAULI, G., KRÜGER, D.H. und KOCH, J.: Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland (Bundesgesundheitsblatt **47**, 661-670, 2004)

VAHLENKAMP, T.W.: T-Zell-vermittelte Pathogenese der felinen Immunschwächevirus (FIV)-Infektion (Vet-MedReport **28**, 3, 2004)

VAHLENKAMP, T.W.: PCR und Western Blot-Diagnostik in der Kleintiermedizin (50. Jahrestagung der FK-DVG. ISBN 3-938026-09-X, 81-82, 2004)

VAHLENKAMP, T.W.: Immunpathogenese der felinen Immunschwächevirus (FIV)-Infektion

(50. Jahrestagung der FK-DVG. ISBN 3-938026-09-X, 110-111, 2004)

VOIGT, H., MUSCHKO, K., WIENHOLD, D., MERANT, C., MARQUARDT, C., SAALMÜLLER, A., PFAFF, E., LEPOTIER, M.-F. und BÜTTNER, M.: Comparative analysis of cellular and humoral immune responses in swine vaccinated with novel classical swine fever (CSF) vaccines (Immunobiology **209**, 402, 2004)

WERNER, O.: Klassische Geflügelpest – Diagnostik und Möglichkeiten der Impfung (Proc. 23, INTERNAT. Veterinärkongress, Bad Staffelstein, 26./27. April 2004, S. 202-213)

WERNER, O.: Geflügelpest in Südostasien (Bioforum 4/2004, S. 22-23)

WERNER, O., GLOBIG, A. und STARICK, E.: Aviäre Influenza – Ergebnisse der Überwachungsuntersuchungen bei Hausgeflügel und Wildvögeln (DVG, Arbeitskreis Tierseuchenbekämpfung, September 2004, Tagungsband)

WERNER, O. und METTENLEITER, T.C.: Geflügelpest – eine Gefahr nicht nur fürs Federvieh (Forschungsreport 1/2004, 28-31, 2004)

WERNER, O. und METTENLEITER, T. C.: Geflügelpest – eine Gefahr nicht nur fürs Federvieh (RUNDSCHAU für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung **56**, 271-273, 2004)

WIESMÜLLER, K.-H., HÖHLICH, B.-J., PFAFF, E. UND SAALMÜLLER, A.: Foot-and-Mouth Disease Virus-specific linear B-cell epitopes differentiate between infected and vaccinated cattle (Innovation and perspectives in solid phase synthesis & combinatorial libraries. Editor: Roger Epton, Mayflower Worldwide Limited, Kingswinford, England. 49-52, 2004)

ZILLER, M.: Effect of omitting outliers on the uncertainty of data-based prediction. (Proc. International Conference on Statistics in Health Sciences, 23.-25. Juni, 2004, Nantes, Frankreich, pp. 320-321, 2004)

3 Habilitationen, Dissertationen und Diplomarbeiten

Dissertationen

ENGEL-HERBERT, I.: Untersuchungen zur Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Newcastle Diseaes Viren (Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

KÖLLNER, B.: Charakterisierung von Leukozytenfunktionen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) mit Hilfe monoklonaler Antikörper (Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock)

KOPP, M.: Molekulare Grundlagen der Herpesvirusmorphogenese: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der Tegumentproteine UL11, UL46 und UL47 des Pseudorabiesvirus (Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

MATTLINGER, C.: T- und B-Zellepitope von Glykoproteinen des Pseudorabiesvirus (Suid Herpesvirus 1) (Universität Tübingen)

POTTGIESSER, C.: Genexpressionsanalysen am Herzmuskel bei Kindern mit angeborenen Herz-Gefäß-Fehlbildungen (München)

REIMANN, I.: Charakterisierung und trans-Komplementierung von Replikons des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Diplomarbeiten

FUCHS, C.: *In vitro* und *in vivo* Konversion von markierten und durch das Baculovirus-Expressionssystem exprimierten GFP-Prionfusionsproteinen (Fakultät für Biologie, Universität Tübingen)

GOLDMANN, K.: Untersuchungen zur Funktion des VP5 des Virus der Infektiösen Bursitis bei der viralen Replikation (Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

HESSMANN, M.: Untersuchungen zur frühen Immunpathogenese der Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) (Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie, Technische Universität Dresden)

STACHOWSKI, A.: Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen MHC II von Salmoniden (Technische Universität Dresden)

4 Vorträge und Poster

Auf wissenschaftlichen Fachtagungen und Kongressen im In- und Ausland wurden von den Mitarbeitern des FLI zahlreiche Vorträge und Poster präsentiert. Aus Platzgründen werden diese nicht einzeln aufgeführt.