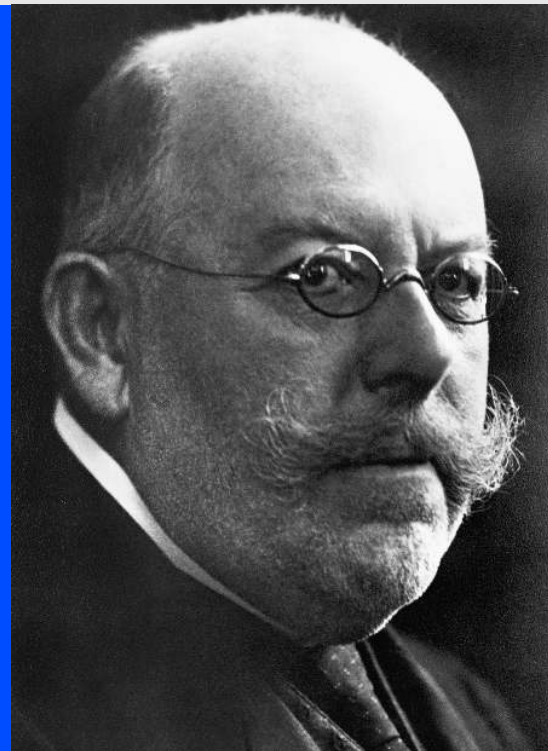


1910–2010



100 JAHRE

JAHRESBERICHT 2009



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institut for Animal Health

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
BUNDEFORSCHUNGSINSTITUT FÜR TIERGESUNDHEIT

JAHRESBERICHT 2009

Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz

IMPRESSUM

Herausgeber

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Der Präsident

Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems

Telefon: 038351 70

Fax: 038351 7-226; 7-151

E-mail: poststelle@fli.bund.de

Internet: www.fli.bund.de

Präsident

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

Redaktion

E. Reinking

A. Beidler

Dr. J. Schell (Kap IV, VIII)

Abbildungen, Fotos

Friedrich-Loeffler-Institut, soweit nicht anders vermerkt

Satz und Druck

Druckhaus Panzig, Greifswald

Insel Riems, Mai 2010

ISSN 1861-0005

VORWORT

Sehr geehrte Damen und Herren,
liebe Kolleginnen und Kollegen,

das Jahr 2009 verlief für das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI) im Vergleich zu den Vorjahren relativ „unaufgeregt“. Trotzdem hat sich einiges getan. So wurde die neue Struktur in der Ressortforschung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) konsolidiert und weiter entwickelt.

Unsere ursprünglichen Kernthemen, Infektionskrankheiten landwirtschaftlicher Nutztiere, beschäftigten uns auch ohne größere Tierseuchenausbrüche nicht unerheblich. Bei der Blauzungenkrankheit stand die Diskussion um die Aufhebung der Impfpflicht im Vordergrund. Die „Schweinegrippe“ – das große Thema des Jahres – warf auch am FLI Fragen auf, nicht nur hinsichtlich der korrekten Bezeichnung. Die möglichen Auswirkungen des Klimawandels auf die Tiergesundheit wurden im Rahmen eines gemeinsam mit der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina ausgerichteten internationalen Symposiums diskutiert. Für die Arbeitsgruppe Internationale Tiergesundheit bildeten Einsätze in Afrika und Asien Schwerpunkte. Verschiedene asiatische Länder wurden beim Aufbau einer zuverlässigen Diagnostik der aviären Influenza unterstützt.

Für abwechslungsreiche Forschungsaufgaben sorgten aber auch ganz andere Fragen wie die Bedeutung von Spurenelementen und Auswirkungen von Mykotoxinen in Tierfutter, die Evaluierung genetischer Diversität beim Geflügel, die Stresserkennung bei Ferkeln oder der Einfluss von Bodenart und Besatzdichte auf die Gesundheit von Mastbullen.

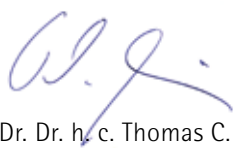
Sie sehen, wir haben eine vielseitige Themenpalette zu bieten, die wir Ihnen zumindest in Auszügen in diesem Jahresbericht vorstellen.

Im vergangenen Jahr beschäftigten uns weiterhin die Baumaßnahmen an drei Standorten des FLI. Am Hauptsitz auf der Insel Riems gehen die Arbeiten am Neubau von Labor- und Stallgebäuden gut voran. Das Richtfest im September konnten wir bei sonnigem Wetter mit rund 400 Gästen feiern. Machbarkeitsstudien sind sowohl für die Zusammenführung der niedersächsischen Institute am Standort Mariensee als auch für notwendige Neubauten für Labor- und Stallgebäude in Jena im Entstehen.

Das Jahr 2010 wird ganz im Zeichen unseres 100. Gründungsjubiläums stehen. Die Vorbereitungen für den 10.10.10 laufen auf vollen Touren und Sie sollten sich diesen (Sonn)Tag schon einmal im Kalender fixieren. Im Rahmen eines Tages der offenen Tür sind Sie alle auf der Insel Riems herzlich willkommen!

Wir würden uns freuen, wenn der vorliegende Jahresbericht für Sie eine interessante Lektüre bietet und wünschen Ihnen beim Lesen viel Vergnügen

Ihr



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



INHALTSVERZEICHNIS

I.	AUFGABEN	7
II.	ÜBERBLICK	9
	Organisation	10
	Die Institute	12
	Beschäftigte	18
	Organigramm	20
III.	AUSGEWÄHLTE SCHWERPUNKTTHEMEN	21
	INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (IMB)	
	Wirtszell-abhängige Mechanismen der Replikation zoonotischer Viren: Einfluss unterschiedlicher Lyssavirus Matrixproteine auf die Virusmorphogenese	22
	INSTITUT FÜR VIRUSDIAGNOSTIK (IVD)	
	Klassische Schweinepest beim Wildschwein: Diagnostik, molekulare Epidemiologie und Pathogenese im Kontext der aktuellen KSP-Situation	28
	INSTITUT FÜR INFEKTIONSMEDIZIN (IMED)	
	Influenza A/H1N1/2009 beim Schwein: Aktuelle Situation, tierexperimentelle Studien und Interpretationen	33
	INSTITUT FÜR NEUE UND NEUARTIGE TIERSEUCHENERREGER (INNT)	
	Hepatitis E in Deutschland: Neue Herausforderungen an die veterinärmedizinische Forschung?	40
	INSTITUT FÜR TIERERNÄHRUNG (ITE)	
	B-Vitamine in der Milchviehernährung	45
	INSTITUT FÜR TIERSCHUTZ UND TIERHALTUNG (ITT)	
	Ansprüche von Legehennen an ihre Haltung hinsichtlich des Ruhe- und Staubbadeverhaltens	50
	INSTITUT FÜR BAKTERIELLE INFEKTIONEN UND ZOONOSEN (IBIZ)	
	Schweinebrucellose – Diagnostische Untersuchungen des NRL Brucellose im Zusammenhang mit Ausbrüchen in Mecklenburg-Vorpommern	54
	INSTITUT FÜR MOLEKULARE PATHOGENESE (IMP)	
	Rindertuberkulose – Neue Ansätze in Diagnostik und Typisierung	58
	INSTITUT FÜR NUTZTIERGENETIK (ING)	
	Molekulare Untersuchungen zur Differenzierung von Haushuhnrassen	64
	INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE (IFI)	
	MRNA-basierte Immunprophylaxe gegen Influenzavirusinfektionen	68
	INSTITUT FÜR EPIDEMIOLOGIE (IFE)	
	TSN 3.0 – Das neue Melde- und Krisenmanagementsystem für Deutschland	72
	ARBEITSGRUPPE INTERNATIONALE TIERGESUNDHEIT (AG-ITG)	
	Labordiagnostik aviärer Influenza in Entwicklungsländern: Erfahrungen aus Laos, Nepal und Indonesien	76
IV.	LAUFENDE FORSCHUNGSPROJEKTE	83
	1 Viren	84
	1.1. DNA VIREN	84
	1.1.1 Familie <i>Herpesviridae</i>	84
	1.1.2 Familie <i>Alloherpesviridae</i>	87
	1.1.3 Familie <i>Papillomaviridae</i>	88
	1.1.4 Familie <i>Iridoviridae</i>	88

1.2 RNA VIREN	89
1.2.1 Familie <i>Reoviridae</i>	89
1.2.2 Familie <i>Rhabdoviridae</i>	89
1.2.3 Familie <i>Paramyxoviridae</i>	92
1.2.4 Familie <i>Orthomyxoviridae</i>	92
1.2.5 Familie <i>Bunyaviridae</i>	99
1.2.6 Familie <i>Picornaviridae</i>	101
1.2.7 Familie <i>Caliciviridae</i>	102
1.2.8 Familie <i>Flaviviridae</i>	102
1.2.9 Familie <i>Coronaviridae</i>	104
2 Bakterien	104
2.1 Bakterien allgemein	104
2.2 Brucellen	105
2.3 Burkholderien	105
2.4 Chlamydien	105
2.5 Coxiellen	106
2.6 <i>Escherichia coli</i>	107
2.7 Mykobakterien	107
2.7.1 Paratuberkulose	108
2.8 Mykoplasmen	108
2.9 Salmonellen	109
2.10 Biomarker zur Erkennung von Infektionen	110
2.11 Bakterielle Resistenzforschung	110
3 PARASITEN	113
3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	113
3.2 <i>Neospora caninum</i>	114
3.3 <i>Besnoitia besnoiti</i>	115
3.4 <i>Echinococcus multilocularis</i>	115
4 Prionen – Transmissible spongiforme Enzephalopathien	116
5 Veterinärmedizinische Entomologie	119
6 Immunologie und Pathophysiologie	120
6.1 Immunologische Grundlagen	120
6.2 Immunsystem der Fische	120
6.3 Allgemeine Impfstoffentwicklung und Immuntherapie	121
6.4 Pathophysiologie	123
7 Tierschutz /Tierhaltung	123
8 Tierernährung	128
8.1 Futtermittelzusatzstoffe	128
8.1.1 Spurenelemente	128
8.1.2 Vitamine	129
8.1.3 Nicht lebensnotwendige Futtermittelzusatzstoffe	129
8.2 Mykotoxine	130
9 Züchtung und genetische Ressourcen	131
9.1 Monitoring, Charakterisierung und Erhaltung tiergenetischer Ressourcen	131

9.2 Biotechnologie	133
9.3 Funktionelle Genetik und Bioregulation	137
10 Arbeitsgruppe Internationale Tiergesundheit (AG-ITG)	139
11 Epidemiologie und Risikobewertung	140
11.1 Informatik	140
11.2 Biostatistik	142
12 Zellbank	142
Beteiligung des FLI an nationalen und internationalen Forschungsverbänden und Exzellenznetzwerken	144
V. BEHÖRDLICHE AUFGABEN	147
1 Aufgaben im Rahmen des Gentechnikrechts	148
2 Nationale Referenzlaboratorien	148
3 Rechtliche Grundlagen der Tierseuchenbekämpfung	169
3.1 Anzeigepflichtige Tierseuchen	169
3.2 Meldepflichtige Tierkrankheiten	172
3.3 Weitere nationale Referenzlabore am FLI	172
VI. ORGANISIERTE VERANSTALTUNGEN	173
VII. PRESSE- UND ÖFFENTLICHKEITSARBEIT	177
VIII. KOOPERATIONEN MIT HOCHSCHULEN UND MITARBEIT IN WISSENSCHAFTLICHEN GREMIEN	181
1 Vorlesungs- und Hochschultätigkeit	182
2 Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Gremien	184
3 Redaktionelle Mitarbeit in wissenschaftlichen Zeitschriften	190
IX. VERÖFFENTLICHUNGEN	193
1 Veröffentlichungen des Friedrich-Loeffler-Instituts	194
2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen	194
2.1 Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften	194
2.2 Veröffentlichungen in nicht referierten Zeitschriften / Conference Proceedings	206
2.3 Buchbeiträge	209
3 Habilitationsschriften, Dissertationen, Diplomarbeiten, Masterarbeiten, Bachelor Theses, Vorträge und Poster, Auszeichnungen und Preise	210
3.1 Habilitationen	210
3.2 Dissertationen	210
3.3 Diplomarbeiten	211
3.4 Masterarbeiten	212
3.5 Bachelor Theses	212
3.6 Vorträge und Poster	212
3.7 Auszeichnungen und Preise	212

I. AUFGABEN

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

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

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

Die Aufgaben des FLI bezüglich Tierseuchen und Zoonosen sind in § 4 des Tierseuchengesetzes, in § 14 der Tierimpfstoff-Verordnung sowie in § 16 Abs. 4 des Gentechnikgesetzes festgelegt.

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

Nachweismethoden. Am FLI steht dabei die Zulassung veterinärmedizinischer Infektionsdiagnostika im Vordergrund. Im Jahr 2009 wurden insgesamt 22 Zulassungen und 632 Chargenfreigaben vorgenommen.

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

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

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

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

II. ÜBERBLICK

ORGANISATION

HAUPTSITZ INSEL RIEMS

Friedrich-Loeffler-Institut
 Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
 Südufer 10
 17493 Greifswald-Insel Riems
 Tel.: (038351) 7-0
 Fax: (038351) 7-219, 7-151, 7-226

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

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

STANDORT BRAUNSCHWEIG

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

Institut für Tierernährung

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

STANDORT CELLE

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

Institut für Tierschutz und Tierhaltung

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

STANDORT JENA

Friedrich-Loeffler-Institut
 Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
 Naumburger Str. 96a
 07743 Jena
 Tel.: (03641) 8042-0
 Fax: (03641) 8042-228, 8042-350

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
 Institut für molekulare Pathogenese

Örtl. admin. Vertreter des Präsidenten: Direktor und Professor PD Dr. med. vet. H. Neubauer
 Örtl. Verwaltungsleiter: T. Honnef

STANDORT MARIENSEE

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

Institut für Nutztiergenetik

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

STANDORT TÜBINGEN

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

Institut für Immunologie

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

STANDORT WUSTERHAUSEN

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

Institut für Epidemiologie

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

DIE INSTITUTE

INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (IMB)

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

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

Vertretung: Direktor und Professor Dr. G. Keil

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

J. Bogs, D. Deckers, S. Gohrbandt, J. Heinrich, J. Hundt, A. Kreibich, J. Kuhn, B. Möhl, F. Müller, J. Orbanz, S. Pavlova, R. Pollin, Dr. R. Portugal, K. Ramp, D. Schröer, F. Schuster, M. Skiba, Dr. O. Stech

INSTITUT FÜR VIRUSDIAGNOSTIK (IVD)

Das **Institut für Virusdiagnostik** bearbeitet veterinärmedizinisch bedeutsame Viruserkrankungen bei Nutztieren vorrangig aus diagnostischer und differenzialdiagnostischer Sicht. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf anzeigepflichtigen Tierseuchen. Im Institut werden daher eine Reihe Nationaler Referenzlaboratorien geführt, u. a. für Klassische Schweinepest, Geflügelpest, Newcastle Disease, Infektionen mit Bovinem Herpesvirus Typ 1, Infektiöse Anämie der Einhufer, Teschener Krankheit, Maul- und Klauenseuche, Ve-

sikuläre Schweinekrankheit, Afrikanische Schweinepest und Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease. Hinzu kommen Referenzlabore für exotische Tierseuchen wie die Pest der Kleinen Wiederkäuer, Lumpy-Skin-Krankheit, Rinderpest oder Affenpocken. Die Laboratorien für Geflügelpest, Newcastle Disease und BHV-1 sind zudem als Referenzstellen der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) anerkannt. Im Institut werden Verfahren für die Diagnose virusbedingter Tierkrankheiten erarbeitet, verbessert und validiert, Zulassungsuntersuchungen von Diagnostika entsprechend Tierseuchengesetz vorgenommen sowie kommerziell nicht verfügbare Labordiagnostika entwickelt und bereitgestellt. Außerdem betreibt das IVD Prophylaxe- und Pathogenforschung bei ausgewählten Erregern, beispielsweise für Schweinepest, Maul- und Klauenseuche sowie Aviäre Influenza. Der im Institut etablierten Virusbank obliegt die Sammlung, Charakterisierung und Pflege von authentischen Virusstämmen und homologen Antiseren. Die Herstellung monoklonaler Antikörper bildet einen zusätzlichen Arbeitsbereich.

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. M. Beer

Vertretung: Direktor und Professor Dr. H. Schirrmeyer

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

K. Brehm, M. Eschbaumer, Dr. S. Fereidouni, Dr. A. Gall, J. Hänel, R. Häuslaigner, Dr. D. Kalthoff, Dr. K. Kühn, I. Leifer, T. Letzel, K. Mischkale, I. Müller, Dr. A. Postel, Dr. M. Rudolf, R. Wäckerlin, A. Wegelt, K. Wernicke, J. Zemke

INSTITUT FÜR INFEKTIONSMEDIZIN (IMED)

Im **Institut für Infektionsmedizin** steht angewandte Forschung zur Ätiologie und Pathogenese viral, bakteriell und multifaktoriell bedingter Krankheiten bei Nutztieren im Mittelpunkt. Ziele der Arbeiten sind die Entwicklung immunprophylaktischer Maßnahmen und die Ausarbeitung von Bekämpfungsstrategien. Bei der Aufklärung von Erreger-Wirtstier-Beziehungen, d. h. dem Infektions- und Krankheitsablauf im Tier, setzt das Institut virologische, bakteriologische, molekularbiologische und immunologische Methoden ein. Nach tierexperimentellen Studien kommen zudem pathomorphologische und molekularbio-

logische Methoden in Verbindung mit der elektronenmikroskopischen Analyse von Ultrastrukturen zum Einsatz. Arbeitsschwerpunkte bilden die Diagnostik und Bekämpfung von virusbedingten Fischkrankheiten, die Immunologie von Nutzfischen sowie Entomologie und Faktorenkrankheiten. In Zusammenarbeit mit anderen Instituten des FLI führt das IMED Studien zur molekularen Diagnostik und Pathogenese der Klassischen Geflügelpest unter besonderer Berücksichtigung des hämorrhagischen Syndroms, zur Immunpathologie boviner Retrovirusinfektionen und zur Neuropathologie animaler Herpesviren durch. Multifaktoriell bedingte Infektionskrankheiten (Faktorenkrankheiten) werden beim Schwein sowie bei Nutzfischen untersucht. Das IMED 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. Es führt die Nationalen Referenzlaboratorien für anzeigepflichtige Tierseuchen bei Fischen (u. a. Infektiöse Hämato-poetische Nekrose, Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden, Infektiöse Anämie der Lachse, Koi-Herpesvirusinfektion der Karpfen), für anzeigepflichtige Tierseuchen bei Weichtieren (u. a. Infektion mit *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa*, *Marteilia refringens*) und für anzeigepflichtige Tierseuchen bei Krebsen (u. a. Weißpünktchenkrankheit, Taura-Syndrom). Darüber hinaus sind im Institut das OIE- und nationale Referenzlabor für Enzootische Bovine Leukose sowie die nationalen Referenzlabore für Caprine Arthritis/Enzephalitis und Maedi/Visna beim Schaf angesiedelt.

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. Dr. T. W. Vahlenkamp

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

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

C. Winkler, S. Ohlemeyer, Dr. F. Takizawa, S. Sczodrok, P. Kotterba, A. Breithaupt, G. Busch, T. Korytář, M. Gac, D. Deckers

INSTITUT FÜR NEUE UND NEUARTIGE TIERSEUCHENERREGER (INNT)

Das Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger entwickelt neue Nachweismethoden für Prion-Erreger (BSE, Scrapie) und zur Differenzierung von Prion-Stämmen. Das

INNT führt experimentelle BSE-Pathogenesestudien mit Rindern und kleinen Wiederkäuern durch und besitzt eine nationale BSE-Probenbank. Es wurden transgene Mausmodelle zur Analyse der Übertragbarkeit dieser Erreger über Speziesgrenzen hinweg sowie zur Bedeutung der Glykosylierung des Prion-Proteins entwickelt. Die bei der Prion-Umfaltung beteiligten Bereiche des Prion-Proteins werden in Scrapie-infizierten Zellkulturen und zellfreien Systemen untersucht. Neben diesen neuartigen Tierseuchenerregern bearbeitet das INNT schwerpunktmäßig im FLI virale Zoonosen, die durch Flaviviren (West-Nile-Fieber-, Japanische-Enzephalitis-Viren u. a.), Alphaviren (Amerikanische Pferdeenzephalomyelitis-Viren), Bunyaviren (Hanta-, Rift-Valley-Fieber-, Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Viren u. a.), Hepeviren (Hepatitis-E-Viren), Filoviren (Marburg-, Ebola-Viren) und durch Henipaviren (Hendra-, Nipah-Viren) verursacht werden. Laborarbeiten zu letzteren Erregern erfordern teilweise höhere Sicherheitsstufen (L3, L4), die derzeit am FLI noch nicht oder nur eingeschränkt zur Verfügung stehen. Im Rahmen des Neubaus wird das INNT für den Betrieb des S4-Bereiches verantwortlich sein. Daher konzentrieren sich die Forschungsarbeiten derzeit vorrangig auf die Etablierung diagnostischer Nachweisverfahren (quantitative real-time RT-PCR, Microarray-Technologie sowie serologische und antigenetische Nachweistechiken).

Im INNT werden die Aufgaben der Nationalen Referenzlaboratorien für BSE, Scrapie, viralbedingte Pferdeenzephalomyelitiden, West-Nile-Viren, Japanische Enzephalitis-Viren, virale Pferdeenzephalomyelitiden (Alphaviren), Bunyaviren (hier: Hantaviren), Rift-Valley-Fieber-Viren, Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Viren, Filoviren und Henipaviren wahrgenommen. Das INNT betreibt den Geschäftsstellenstandort 'Tiermedizin' der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen, das Netzwerk 'Nagetier-übertragene Pathogene' sowie eine Technologie-Plattform zur Erstellung transgener Mäuse mit zugehöriger SPF-Haltung.

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

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

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

S. Jäckel, K. Tauscher, P. Dremsek, S. Schmidt, A. Wiethölter, M. Franz, S. Freyse, E. Ortega Soto, M. Schlegel, K. Schmidt, D. Seidowski, B. Strohmeier, W. Wohlfromm, A. Vina Rodriguez

INSTITUT FÜR TIERERNÄHRUNG

Das **Institut für Tierernährung** forscht auf den Gebieten Ernährungsphysiologie, Futtermittelkunde und Tierfütterung. Im Mittelpunkt der Arbeiten stehen tiergesundheitsliche Aspekte als Voraussetzung für eine effektive Umwandlung von Futterinhaltsstoffen in qualitativ hochwertige Lebensmittel tierischer Herkunft oder andere Leistungen von Tieren bei einer möglichst geringen Umweltbelastung.

Dem Einfluss verschiedener essenzieller und unerwünschter Nahrungsbestandteile auf das Immunsystem kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. So wird die Relevanz einiger Vitamine sowie Spurenelemente als Vertreter der essenziellen Nahrungsbestandteile auf das Immunsystem verschiedener Tierarten untersucht. Von den unerwünschten Nahrungsbestandteilen sind insbesondere bestimmte Mykotoxine mit immun-modulierender Wirkung von Interesse, da sie in Futtermitteln in höheren Konzentrationen vorkommen können. Hierzu führt das Institut für Tierernährung bei Wiederkäuern, Schweinen und Geflügel Untersuchungen durch, um die Wirkmechanismen aufzuklären, Möglichkeiten der Dekontamination von belasteten Getreidepartien aufzuzeigen und kritische Konzentrationen im Futter abzuschätzen. Hinzu kommt die Analytik der Toxine sowie deren Metaboliten in Lebensmitteln tierischen Ursprungs („carry over“).

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

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

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

Vertretung: Wiss. Rat Dr. U. Meyer

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

B. Brosig, K. Franke, M. Lohölter, J. Pappritz, V. Ragaller, D.
Rohweder, A.S. Röttger, D. v. Soosten

INSTITUT FÜR TIERSCHUTZ UND TIERHALTUNG

Das **Institut für Tierschutz und Tierhaltung** führt grundlagen- und anwendungsorientierte Forschungsprojekte zur

Bewertung und Weiterentwicklung tiergerechter Haltungssysteme sowie zu Transport, Betäubung und Tötung landwirtschaftlicher Nutztiere durch. Die Forschungen basieren auf der Erkenntnis, dass sich die aktuelle Anpassungsfähigkeit von Individuen an ihre Haltung aus der stammesgeschichtlichen Anpassung an den jeweiligen Lebensraum ableitet. Unterschiede in der Anpassungsfähigkeit werden dabei durch die genetische Variabilität und individuelle Erfahrungen verursacht. In die Forschung werden zudem ökonomische Aspekte, Managementaspekte wie die Bestandshygiene sowie durch die Tierhaltung verursachte Umweltbelastungen einbezogen, um Konflikte zwischen Ökonomie, Tier- und Umweltschutz zu vermeiden. Tierschutzrelevante Probleme in der Haltung sind nur zu verstehen, wenn die Mechanismen, durch die die Anpassungsreaktionen der Tiere vermittelt werden, bekannt sind. Hierbei bilden motivationale und kognitive, stressphysiologische und immunologische sowie molekulare Steuerungsmechanismen des Verhaltens einen Schwerpunkt. Als Faktoren, die die Anpassungsreaktionen der Tiere an die Haltungsbedingungen festlegen oder modifizieren, werden insbesondere Reifungsprozesse, genetische Faktoren, Ernährung und Gesundheitsstatus der Tiere berücksichtigt. Ausgehend von den Anpassungsmechanismen lassen sich Indikatoren für eine objektive Erfassung der Auswirkungen von Haltungssystemen ableiten. Für praxistaugliche Umsetzung sind hierbei Indikatoren wichtig, die sich experimentell wiederholen und validieren lassen. Dazu gehören Verhaltensänderungen und -störungen, Stressreaktionen, Störungen des Immunsystems und veränderte Genaktivitäten, pathologische Merkmale sowie Morbidität und Mortalität. Weiterhin sollten Bewertungsverfahren möglichst wenig Aufwand erfordern und wenig störanfällig sein. Bewertungsindikatoren und -verfahren bilden auch die Werkzeuge, um Verbesserungen in der tiergerechten Haltung von Nutztieren zu entwickeln und zu prüfen. In enger Zusammenarbeit mit der Praxis werden hierbei potentiell problematische Haltungsfaktoren identifiziert und untersucht. Daraus resultieren Maßnahmen, die negative Auswirkungen der Haltung reduzieren oder vermeiden, z. B. durch veränderte Haltungseinrichtungen, Fütterung, Tier-Mensch-Interaktionen sowie verbesserte Transportbedingungen, Betäubungs- sowie Schlachtverfahren.

Leitung: Direktor und Professor Dr. L. Schrader

Vertretung: Dr. M. Marahrens

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Wiss. Rätin z. A. Dr. J. Berk, Dr. B. Bünger, Wiss. Rat Dr. G.
Heil, Dr. J. Kjaer, Wiss. Oberrat C. Otto, Wiss. Oberrat Dr. Loc
Phi van, Dr. S. Petow, Dr. F.-D. Zerbe

Drittmittelbeschäftigte:

J. Dannenbrink, Dr. B. Scholz, K. Steinkamp, T. Pickel,
N. Kleinschmidt, A.H. Truar

INSTITUT FÜR BAKTERIELLE INFEKTIONEN UND ZOONOSEN (IBIZ)

Das **Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen** forscht zur Ätiologie, Pathogenese und Epidemiologie von vorwiegend bakteriell bedingten Infektionskrankheiten von Nutz-, Heim- und Wildtieren. Ein bedeutender Teil der Arbeiten ist auf Krankheiten und Krankheitserreger ausgerichtet, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden können (Zoonosen). Die Ergebnisse dieser Arbeiten fließen in die Entwicklung und Optimierung diagnostischer Verfahren sowie die Erarbeitung von Bekämpfungsstrategien ein. Im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten stehen durch *Salmonellen*, *Campylobacter*, *Brucellen*, *Clostridien*, *Francisellen*, *Burkholderien* und *Mykoplasmen* bedingte Infektionen. Unabhängig vom jeweiligen Erreger werden schwerpunktmäßig Untersuchungen zur Erregerprävalenz durchgeführt, Übertragungswege und -mechanismen charakterisiert, Fragen der Erregerpersistenz bearbeitet, Infektionsketten und epidemiologische Zusammenhänge mit Hilfe klassischer und molekularer Methoden aufgedeckt, die zoonotische Bedeutung bestimmter Erreger ermittelt, Infektionsmodelle etabliert und therapeutische Möglichkeiten im Tiermodell geprüft. Das IBIZ führt die Nationalen Referenzlaboratorien für *Brucellose*, *Campylobacteriose*, *Tularämie*, *kontagiöse equine Metritis*, *Milzbrand*, *Rauschbrand*, *Vibrionenseuche der Rinder*, *Rotz*, *Salmonellose der Rinder* und durch *Zecken* übertragene Krankheiten. Die Laboratorien für *Brucellose* und *Rotz* sind zudem als Referenzlabore der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) anerkannt.

Leitung: Direktor und Professor PD Dr. H. Neubauer

Vertretung: PD Dr. H. Tomaso

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

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

INSTITUT FÜR MOLEKULARE PATHOGENESE (IMP)

Das **Institut für molekulare Pathogenese (IMP)** hat die Aufgabe, die Interaktion zwischen bakteriellen Erregern von Tierseuchen und Zoonosen und ihren Wirten auf molekularer Ebene zu charakterisieren, die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich ihrer Relevanz im Gesamtorganismus zu evaluieren und daraus Verfahren zur Prophylaxe und Bekämpfung von Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren zu entwickeln. Wissenschaftliche Schwerpunkte sind

die Aufklärung der Systematik der Chlamydien und die Entwicklung von Strategien zur Bekämpfung von Chlamydiosen bei Tier und Mensch sowie die molekulare Epidemiologie und die Diagnostik von Mykobakterien-Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren (*Rindertuberkulose* und *Paratuberkulose*). Methodische Schwerpunkte sind die Entwicklung innovativer, *Microarray*-basierter Methoden zur schnellen Diagnostik und Differenzierung der Erreger. Für Untersuchungen zur Funktion der molekularen Strukturen auf Erregerseite und ihrer Gegenspieler auf Wirtseite werden bevorzugt *In-vitro*-Modelle mit primären Zellkulturen der Zieltierspezies (*Rind*, *kleine Wiederkäuer*, *Schwein* und *Geflügel*) verwendet. Der Einfluss bakterieller Faktoren auf die komplexen Interaktionen des Gesamtorganismus wird in homologen tierexperimentellen Systemen überprüft. Das IMP führt die Nationalen Referenzlaboratorien für *Tuberkulose* beim *Rind*, *Paratuberkulose*, *Psittakose* sowie *Beschlässe*. Das Labor für *Psittakose* ist zudem als Referenzstelle der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) anerkannt.

Leitung: PD Dr. C. Menge

Vertretung: Dr. K. Sachse

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dr. A. Berndt, Dr. E. Borrmann, Dr. H. Köhler, Prof. Dr. E. Liebeler-Tenorio, PD Dr. I. Moser, Dr. P. Möbius, PD Dr. P. Reinhold PhD, Dr. E. Schubert, Dr. L. Sprague, Dipl.-Ing. E. Thalmann

Drittmittelbeschäftigte:

M. Braukmann, I. Fritsch, J. Lambertz, H. Lenzko, M. Meyer, C. Ostermann, A. Rüttger, S. Sattler, A. Soschinka, A. Vogel

INSTITUT FÜR NUTZTIERGE NETIK (ING)

Wissenschaftliche Fragen der Genetik und genetischen Vielfalt bei landwirtschaftlichen Nutztieren stehen im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten des **Instituts für Nutztiergenetik**. Schwerpunkte bilden Untersuchungen zur Charakterisierung und Erhaltung genetischer Ressourcen, biotechnische Methoden zu deren Erhaltung sowie die Entwicklung informationstechnologischer Strategien, mit denen der Erhalt genetischer Ressourcen auf regionaler und globaler Ebene ermöglicht werden kann. Die Charakterisierung genetischer Ressourcen schließt die Ermittlung individueller phänotypischer Varianz, z. B. bei Wachstum und Fortpflanzung, ein und ermöglicht dadurch die Analyse der Leistungsgrenzen bei Nutztieren. Ein weiterer Schwerpunkt der wissenschaftlichen Arbeiten sind moderne reproduktionsbiologische Verfahren, wie *In-vitro*-Produktion von Embryonen, Spermientrennung, somatisches Klonen und die Stammzelltechnologie, die sowohl für den Erhalt genetischer Ressourcen als auch für zukunftsweisende Zuchtprogramme von großer Bedeutung sind. Neue molekulargenetische Er-

kenntnisse in Kombination mit reproduktionsbiologischen Verfahren erlauben die Zucht transgener Tiere für unterschiedliche Anwendungsperspektiven, wodurch die genetische Vielfalt erweitert werden kann. Hierzu gehört auch die Entwicklung neuer biomedizinischer Anwendungsmodelle mit einem Schwerpunkt bei der Xenotransplantation. Ferner werden Arbeiten zu den Themenbereichen molekulare Mikrobiologie und Antibiotikaresistenz durchgeführt, die im Zusammenhang mit der Diagnostik und Bekämpfung bakterieller Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren wichtig sind. Typisch für die aktuelle Forschung ist die Einbindung in nationale und internationale Forschungsverbände. Hervorzuheben ist die Beteiligung am Exzellenz-Cluster „REBIRTH“, das an der Medizinischen Hochschule Hannover angesiedelt ist.

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

Vertretung: Direktor und Professor Dr. Dr. h. c. mult. E. Groeneveld

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

Dr. A. Cunha, Dr. Z. Ducheve, K. Fricke, Dr. J. Heinzmann, W. Garrels, Dr. L. F. Groeneveld, Dr. C. Kehrenberg, Dr. K. Kadlec, Prof. Dr. J. Laurincik, Dr. M. Nowak-Imialek, Dr. M. Oropeza, Dr. B. Petersen

INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE (IFI)

Das **Institut für Immunologie** erforscht die immunologischen Mechanismen von virusbedingten Tierseuchen sowie Prionenerkrankungen. Untersuchungen an verschiedenen Viren tragen zur Verbesserung und Entwicklung neuer Bekämpfungs- und Kontrollstrategien sowie für die Risikoabschätzung bei der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen bei. Das bearbeitete Erregerspektrum reicht von Pestiviren (Virus der klassischen Schweinepest; Virus der bovinen Virusdiarrhoe), über Caliciviren (Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche) und Herpesviren (Pseudorabiesvirus) bis zu Parapockenviren. Erforscht werden die biochemischen Grundlagen der Virusvermehrung und die molekularen Mechanismen der Interaktion von Virus und Immunsystem. Insbesondere aus den Arbeiten zur Attenuie-

rung von Pestiviren sowie den Untersuchungen zum Einsatz des Parapockenvirus als Vektor aufgrund seiner immunstimulierenden Eigenschaften ergeben sich neue Aspekte für die Impfstoffentwicklung. Das IfI beschäftigt sich außerdem mit der Aufklärung der zellulären und humoralen Immunantwort nach Virusinfektionen. Insbesondere Wechselwirkungen des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit Influenzaviren werden untersucht, wobei Pathogenese und Interventionsmöglichkeiten an experimentellen Modellen im Mittelpunkt stehen.

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

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

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

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

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

INSTITUT FÜR EPIDEMIOLOGIE (IFE)

Das **Institut für Epidemiologie** beschäftigt sich mit der Epidemiologie einheimischer Tierseuchen wie Aviäre Influenza, Blauzungenkrankheit oder Klassische Schweinepest, der Prävention nicht einheimischer Infektionskrankheiten und den biomathematischen sowie epidemiologischen Grundlagen der Risikobewertung. Mit modernen epidemiologischen Methoden, die auch auf mathematische Modelle und geographische Informationssysteme zurückgreifen, werden neue Erkenntnisse gewonnen, die in die praktische Tierseuchenbekämpfung einfließen. Darüber hinaus nimmt das Institut behördliche Aufgaben wahr, insbesondere im Zusammenhang mit dem Tierseuchennachrichtensystem (TSN) und dem Trade Control and Export System (TRACES) der Europäischen Union, und beteiligt sich an der Entwicklung elektronischer Werkzeuge des Krisenmanagements im Falle von Tierseuchenausbrüchen. Für epidemiologische Studien setzt das Institut labordiagnostische Untersuchungen

ein. 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 Tierkrankheiten mit wirtschaftlicher und/oder zoonotischer Bedeutung, beispielsweise Tollwut, Q-Fieber, Chlamydiose, Salmonellose, Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli*, Toxoplasmose, Neosporose und Echinokokkose. Die Reservoirfunktion verschiedener Tierpopulationen für Tierseuchenerreger und wirtschaftlich bedeutsame Erkrankungen von Haustieren wird ebenfalls untersucht.

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

Vertretung: Direktor und Professor Dr. M. Kramer

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

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

Drittmittelbeschäftigte:

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

BESCHÄFTIGTE

ÜBERSICHT ÜBER VORHANDENE PERSONALSTELLEN AM FLI - STAND 31.12.2009

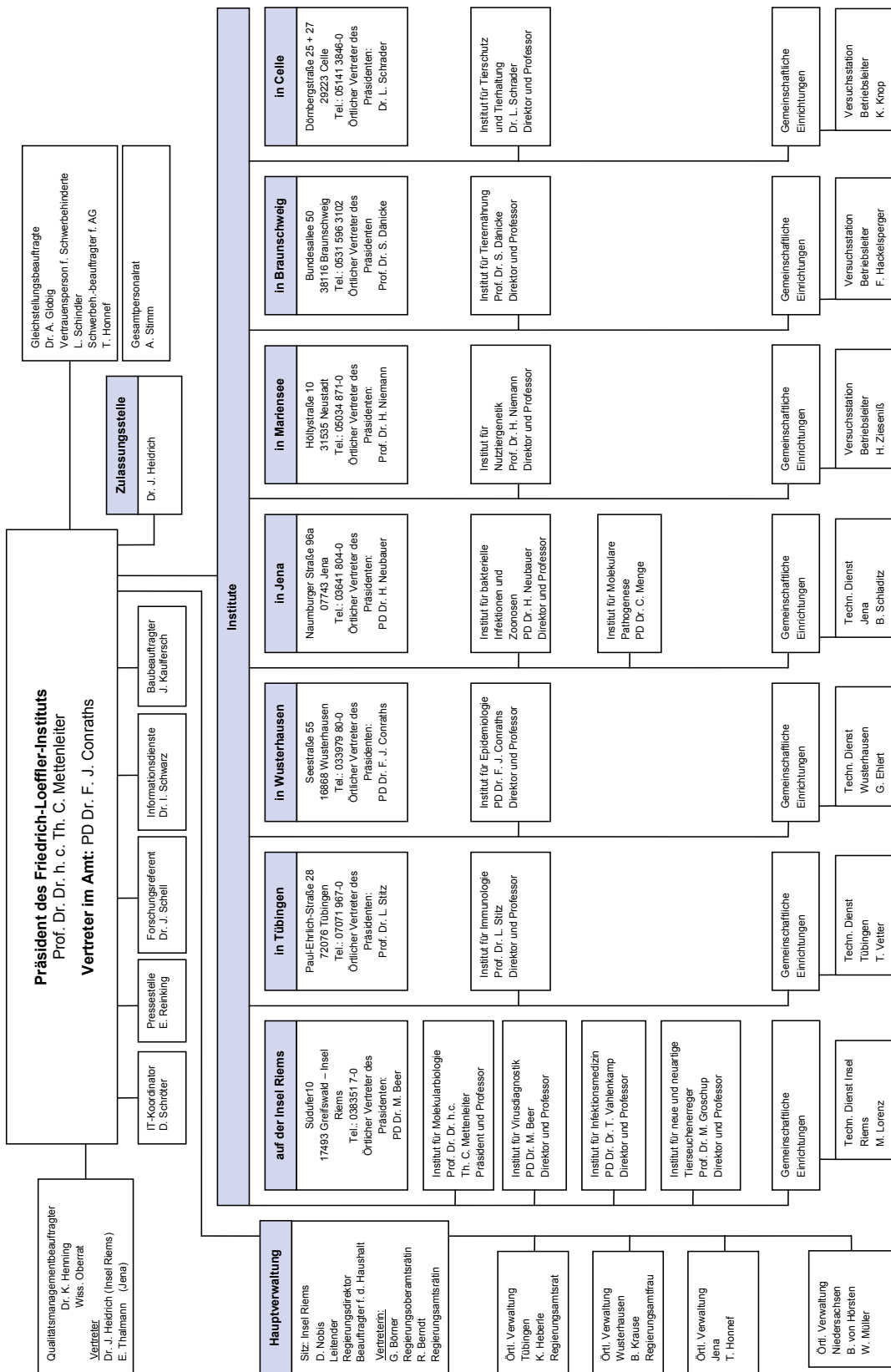
Institut/Einrichtung	Wissenschaftler			Nichtwissenschaftler (ohne Verwaltung)			Verwaltungs- personal			Gesamt
	a	b	ges.	a	b	ges.	a	b	ges.	
BRAUNSCHWEIG										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für Tierernährung	10	2	12	21,28	2,85	24,13				36,13
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Versuchstierhaltung				12,5	2	14,5				14,5
4. Örtliche Verwaltung						0	1,5	1	2,5	2,5
CELLE										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für Tierhaltung und Tierschutz	11	2,5	13,5	20,88	3,75	24,63				38,13
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Informationszentrum				1		1				1
4. Betriebstechnischer Dienst				3		3				3
5. Örtliche Verwaltung				1,5		1,5	6		6	7,5
INSEL RIEMS										
1. Leitung u. zentrale Dienste inkl. Zulassungsstelle	8	3,5	11,5	0,5	2	2,5	1		1	15
2. Institut f. Molekularbiologie	9	8,5	17,5	12	3	15				32,5
3. Institut f. Virusdiagnostik	13	10,5	23,5	20	9	29	1		1	53,5
4. Institut f. Infektionsmedizin	14	2	16	30,9	2	32,9	1		1	49,9
5. Institut für neue und neu- artige Tierseuchenerreger	7	6,5	13,5	13	5,77	18,77	1		1	33,27
6. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Bibliothek	1		1	1	1	2				3
b) Informationszentrum	1		1	4	3	7				8
c) Zentrallager/Nährmedien				2		2				2
d) Fotolabor				2		2				2
7. Betriebstechnischer Dienst	1		1	34,15		34,15	1		1	36,15
8. Hauptverwaltung	2	1	3	13	2	15	31	7	38	56
JENA										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen	14	6	20	20,57	4,3	24,87				44,87
3. Institut für molekulare Pathogenese	12	5,5	17,5	19,44	4,5	23,94				41,44
4. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Informationszentrum	1		1	2		2				3
b) Bibliothek				1		1				1
c) Versuchstierhaltung				9	2	11				11
d) Zentrallager/Nährmedien				3		3				3
5. Betriebstechnischer Dienst				7		7				7
6. Örtliche Verwaltung				4		4	5,65		5,65	9,65

Institut/Einrichtung	Wissenschaftler			Nichtwissenschaftler (ohne Verwaltung)			Verwaltungs- personal			Gesamt
	a	b	ges.	a	b	ges.	a	b	ges.	
MARIENSEE										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für Nutztiergenetik	15	8	23	62,25	4	66,25				89,28
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Informationszentrum				5		5				5
4. Betriebstechnischer Dienst				6	1	7				7
5. Örtliche Verwaltung				7,53		7,53	7,12		7,12	14,65
TÜBINGEN										
1. Sekretariat							1		1	1
2. Institut für Immunologie	8	7	15	13,52	2	15,5				30,5
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Informationszentrum				2		2				2
b) Bibliothek				1		1				1
c) Versuchstierhaltung				6	1	7				7
d) Zentrallager/Nährmedien				1		1				1
4. Betriebstechnischer Dienst				12	1	13				13
5. Örtliche Verwaltung				5	1	6	6,38		6,38	12,38
WUSTERHAUSEN										
1. Sekretariat							2		2	2
2. Institut für Epidemiologie	14	7,25	21,3	15	4,25	19,25				40,55
3. Gemeinsch. Einrichtungen										
a) Bibliothek				1		1				1
b) Versuchstierhaltung				1	1	2				2
4. Betriebstechnischer Dienst				4	1	5				5
5. Örtliche Verwaltung				4		4	3,9		3,9	7,9
Gesamt FLI	141	70,25	211	405	63,42	468,42	73,6	8	81,6	761,27

a) = aus Hausmitteln

b) = aus Zuwendung Dritter und von Bundesbehörden

ORGANIGRAMM STAND 31.12.2009



III. AUSGEWÄHLTE SCHWERPUNKTTHEMEN

Institut für Molekularbiologie (IMB)

WIRTSZELL-ABHÄNGIGE MECHANISMEN DER REPLIKATION ZOOTOTISCHER VIREN: EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER LYSSAVIRUS MATRIXPROTEINE AUF DIE VIRUSMORPHOGENESE

Finke, S.¹, Granzow, H.², Pollin, R.¹, Mettenleiter, T.C.¹

¹Institut für Molekularbiologie, ²Institut für Infektionsmedizin

Viren mit RNA-Genom sind Erreger wichtiger Zoonosen. Eine Ursache für die besondere Bedeutung von RNA-Viren als Zoonoseerreger ist ihre Fähigkeit, in unterschiedlichen Wirten autonom zu replizieren. Neben den typischerweise hohen Mutationsraten und der damit verbundenen Möglichkeit einer schnellen Anpassung an neue Wirte führt bei vielen RNA-Viren auch die Nutzung von ubiquitären zellulären Faktoren, wie z. B. Rezeptoren, zur Fähigkeit, unterschiedliche Wirte zu infizieren.

Obwohl die Morphogenese vieler RNA-Viren relativ autonom erfolgt, zeichnet sich zunehmend ab, dass auch bei klassischen Zoonoseerregern mit breitem Wirtsspektrum zahlreiche zelluläre Faktoren an essentiellen Schritten des viralen Vermehrungszyklus beteiligt sind. Während die Rekrutierung von ubiquitären und konservierten zellulären Funktionen ein breites Wirtsspektrum gewährleistet, ist davon auszugehen, dass Variationen in den Wirtszellfaktoren zu unterschiedlichen Replikationspotentialen führen und damit das Risiko der Infektion heterologer Wirtsspezies mitbestimmen.

Ein klassisches Beispiel für zoonotische Viren sind die Lyssaviren. In dieser Gattung werden das Rabiesvirus (RABV; Tollwutvirus) und RABV-ähnliche Viren zusammengefasst. Obwohl alle Lyssaviren die Fähigkeit besitzen, unterschiedliche Säugerspezies zu infizieren, existieren Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen hinsichtlich Wirtreservoirs und Pathogenität. Vor dem Hintergrund hoher Sequenzhomologien und der besonders für einige Fledermaus-assoziierte Genotypen offensichtlichen Wirtsspezies-abhängigen Replikation und Pathogenese können Lyssaviren als ein geeignetes Modellsystem für die Erforschung von molekularen Mechanismen der Wirtszelladaptation durch RNA-Viren angesehen werden. Mit dessen Hilfe sollen individuelle Funktionen unterschiedlich adaptierter Viren miteinander verglichen werden.

Für die Erforschung der wirtsabhängigen Virusreplikation mit vergleichenden molekularbiologischen und bildgebenden Verfahren wurden Vertreter der Lyssavirus Genotypen 1, 5 und 6 ausgewählt. Während Genotyp 1 RABV ein breites Wirtsspektrum besitzt und in vielen terrestrischen Säugern zu finden ist, zirkulieren die Europäischen Fledermaus-Lyssavirus Typen 1 und 2 (EBLV-1/2) in heimischen

Fledermauspopulationen mit der Breitflügelfledermaus *Eptesicus serotinus* als Hauptwirt. Obwohl EBLV-1/2 weitgehend auf Fledermäuse beschränkt sind, sind sie auch in der Lage, terrestrische Säuger zu infizieren. Diese so genannten Spill-over-Infektionen führen aber nicht zu einer Ausbreitung in den heterologen Wirten („dead end“). Vermutlich müssen adaptive Prozesse stattfinden, bevor es zu einer dauerhaften Etablierung von EBLV-1/2 in neuen Wirtsspezies kommen kann.

Aufgrund geringer Kenntnisse von den molekularen Mechanismen der wirtsabhängigen Virusreplikation ist bisher keine Einschätzung möglich, inwieweit EBLV-1/2 ein Risiko für den Wiedereintrag von Tollwut in terrestrische Säugerspezies darstellen. Die Arbeiten zur wirtszellabhängigen Replikation der Lyssaviren sollen zu einem besseren Verständnis der verantwortlichen Mechanismen beitragen und grundlegende Erkenntnisse über die Virus-Wirt Wechselbeziehungen liefern.

FUNKTION DES LYSSAVIRUS MATRIXPROTEINS

Ein zentrales Protein bei der Lyssavirusreplikation ist das multifunktionelle Matrixprotein M. Im Viruspartikel liegt es zwischen der Hüllmembran (envelope) und dem inneren Ribonukleoprotein (RNP) lokalisiert und bildet so eine Verbindung zwischen Hülle und RNP. M ist für den Zusammenbau und die Freisetzung von Viruspartikeln essentiell (Mebatsion *et al.*, 1999) und kann Virus-Knospeung („budding“) auch in Abwesenheit des viralen Glykoproteins G vermitteln (Mebatsion *et al.*, 1996). Aufgrund der besonderen Rolle des M-Proteins bei der Rekrutierung zellulärer Proteine und Membranen während der Virusmorphogenese sowie im Hinblick auf die Morphogenese-unabhängigen Funktionen, wie z. B. Regulation der RNA-Synthese (Finke und Conzelmann, 2003) oder der Induktion von Apoptose, stellt M eine wichtige Schnittstelle zwischen viralen und zellulären Wirkmechanismen dar, die für das zoonotische Potential von Lyssaviren entscheidend sein könnte.

Die Analyse verschiedener Lyssavirus M-Proteine hinsichtlich ihrer konservierten und Genotyp-spezifischen Funktionen sowie deren Auswirkung auf die Virusreplikation und

Pathogenität war bisher problematisch, da vergleichende Infektionsexperimente mit verschiedenen Virusisolaten zu multifaktoriellen Phänotypen führen und eine Reduktion auf isolierte Genfunktionen nicht möglich ist. Aus diesem Grund wurden chimäre Lyssaviren konstruiert, die vor einem identischen genetischen Hintergrund M-Proteine unterschiedlicher Serotypen exprimierten.

CHIMÄRE RABIES VIREN MIT MATRIXPROTEINEN AUS FLEDERMAUS-ASSOZIIERTEN LYSSAVIREN

Zur Herstellung chimärer RABV wurde die M-kodierende Sequenz eines Genotyp 1 RABV SAD gegen die M Gene der Genotyp 5 und 6 Lyssaviren EBLV-1 und EBLV-2 ausgetauscht (Abb. 1A). Die chimären SAD EBLV-1M und SAD EBLV-2M sowie das Kontrollvirus SAD RABVM konnten erfolgreich als autonom replizierende Viren mit Hilfe eines so genannten reversen genetischen Systems von rekombinanten cDNA-Sequenzen generiert werden. Dies zeigte, dass die Matrixproteine unterschiedlicher Lyssaviren grundsätzlich austauschbar sind. Glykoprotein-spezifische Immunfluoreszenzen, anhand derer im konfokalen Laserscan-Mikroskop das virale Oberflächenprotein in infizierten Zellen und in extrazellulären Virionen nachgewiesen werden kann, zeigten allerdings, dass die Freisetzung von infektiösen, G-haltigen Viruspartikeln bei den chimären Viren im Vergleich zum Kontrollvirus drastisch reduziert war (Abb. 1B). Northern-Blot-Analysen bestätigten, dass virale Genome in den infizierten Zellen akkumulierten. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass hauptsächlich nicht-infektiöse, G-Protein defiziente Viruspartikel freigesetzt wurden, wie es im Falle einer Inkompatibilität der EBLV-1/2 M Proteine mit G zu erwarten gewesen wäre. Obwohl die EBLV-1/2 Proteine also grundsätzlich in der Lage waren, RABV M zu ersetzen, führte der Austausch zu einer drastisch verringerten Freisetzung von Viruspartikeln. Dies wurde auch durch Wachstumskurven bestätigt. Für das chimäre SAD EBLV-1M wurden im Vergleich zum Kontrollvirus 100.000-fach niedrigere infektiöse Virustiter bestimmt (Abb. 1C). Auch für das chimäre SAD EBLV-2M konnten stark reduzierte Virustiter nachgewiesen werden, wenngleich die SAD EBLV-2M Titer 100-fach höher waren als die SAD EBLV-1M Titer.

Die niedrigen Titer für SAD EBLV-1M und SAD EBLV-2M deuteten darauf hin, dass die Morphogenese der chimären Viren durch partielle Inkompatibilitäten der M-Proteine zu den übrigen viralen Proteinen blockiert wurde. Um zu überprüfen, ob die chimären Viren in der Lage waren, die typischen geschossförmigen Lyssaviruspartikel zu bilden, wurde die Virusmorphogenese in infizierten Zellkulturen elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass typische Rhabdoviruspartikel durch Knospung an der Zytoplasmamembran entstanden. Die Häufigkeit der an der Zytoplasmamembran knospenden Viren war allerdings im Ver-

gleich zum Kontrollvirus deutlich reduziert. Im Gegensatz zum Kontrollvirus konnten keine für Lyssaviren als typisch geltenden, intrazellulären Viruspartikel-ähnlichen Strukturen identifiziert werden. Eine Akkumulation von möglichen Zwischenstadien der Virusmorphogenese, wie z.B. unbe-

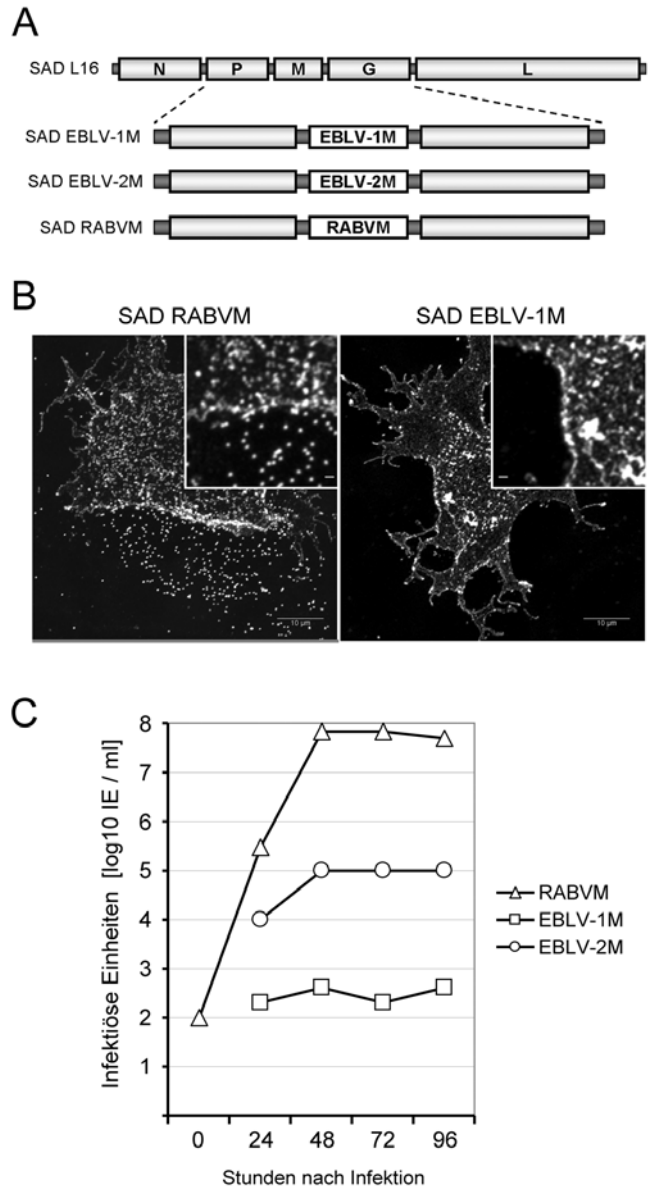


Abb. 1: Chimäre Lyssaviren und Analyse der Virusfreisetzung. (A) Schematische Darstellung chimärer Virusgenome, die vor einem identischen genetischen RABV Hintergrund die Matrixproteine von RABV und den Europäische Fledermaus Lyssavirus Typ 1 und 2 kodieren. (B) Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, dass die Virusfreisetzung aus infizierten Zellen bei SAD EBLV-1M und SAD EBLV-2M deutlich reduziert ist. Der Maßstabsbalken in den Ausschnittsvergrößerungen entspricht 1 µm. (C) Wachstumskurven zeigen, dass die Replikation der EBLV M-Protein kodierenden Viren im Vergleich zum RABV M-Protein kodierenden Virus in der Virusproduktion stark attenuiert sind. (A und C modifiziert nach Finke *et al.*, 2009).

hüllte, durch M kondensierte RNPs oder Anreicherungen von Viruspartikeln an der Zelloberfläche, die bei Defekten im Abschnüren von der Zelle zu erwarten sind, waren nicht zu beobachten.

SELEKTION EINER CHIMÄREN ESCAPE-MUTANTE

Um eine Anpassung der heterologen EBLV-1 und EBLV-2 M-Proteine an das RABV-Genom zu erzielen, wurden serielle Viruspassagen in BSR T7/5-Zellen durchgeführt. Ein Vergleich der Größe der Infektionsherde (Foci) in infizierten Zellkulturen zeigte, dass das passagierte SAD EBLV-1Mpass sich bereits nach drei Passagen deutlich besser ausbreitete (Abb. 2A). Dagegen war für SAD EBLV-2Mpass, das bereits direkt nach dem Rescue zum Kontrollvirus vergleichbare Infektionsherde ausbildete, keine Steigerung zu beobachten. Immunfluoreszenztests ergaben, dass SAD EBLV-1Mpass im Gegensatz zu SAD EBLV-1M (vgl. Abb. 1B) zur effizienten Freisetzung extrazellulärer Virionen in der Lage war (Abb. 2B). Wachstumskurven zeigten, dass die Virusproduktion für SAD EBLV-1Mpass und SAD RABVM nahezu identisch war, während die Titer für SAD EBLV-2M zehnfach niedriger blieben (Abb. 2C). Die gesteigerte Ausbreitung von SAD EBLV-1Mpass und die zum Kontrollvirus vergleichbare Wachstumskinetik zeigten, dass adaptive Mutationen im Genom von SAD EBLV-1Mpass zu einer Steigerung der Virusproduktion führten. Obwohl die Ausbreitung in Zellkultur nicht messbar gesteigert war (Abb. 2A), replizierte auch SAD EBLV-2Mpass nach drei Passagen zu erhöhten Titern (Abb. 2C). Dies deutet darauf hin, dass auch hier kompensatorische Mutationen aufgetreten sind. Da im M-Gen von SAD EBLV-2Mpass keine Veränderungen gefunden wurden, werden Mutationen in anderen Virusproteinen vermutet. Die Sequenzierung entsprechender Genombereiche steht allerdings noch aus.

Die rasche Selektion von SAD EBLV-1Mpass deutet auf eine sehr schnelle Akkumulierung von Mutationen hin. Der starke Selektionsdruck auf Grund der geringen Ausbreitungsfähigkeit in infizierten Zellkulturen (Abb. 2A) und einer drastisch reduzierten Virusproduktion (Abb. 1C) war demnach ausreichend, das heterologe EBLV-1M für die übrigen RABV Proteine kompatibel zu machen. Im Hinblick auf den klonalen Charakter des von cDNA hergestellten SAD EBLV-1M war die Geschwindigkeit des Auftretens einer Escape-Mutante überraschend, da für RNA-Viren typische Quasispezies mit bereits vorhandenen Escape-Mutationen ausgeschlossen werden konnten. Die schnelle Adaptation deutete ferner darauf hin, dass wenige Veränderungen im viralen Genom zu einem drastischen Anstieg der Virusproduktion geführt haben. Zur Klärung der Frage, inwieweit EBLV-1M oder potentiell mit M interagierende virale Proteine Mutationen aufwiesen, wurden die Nukleotidsequenzen der M- und N-Gene sowie Teile des G-Gens sequenziert. Einzig im EBLV-1M ORF konnte eine Mutation identifiziert werden, die an

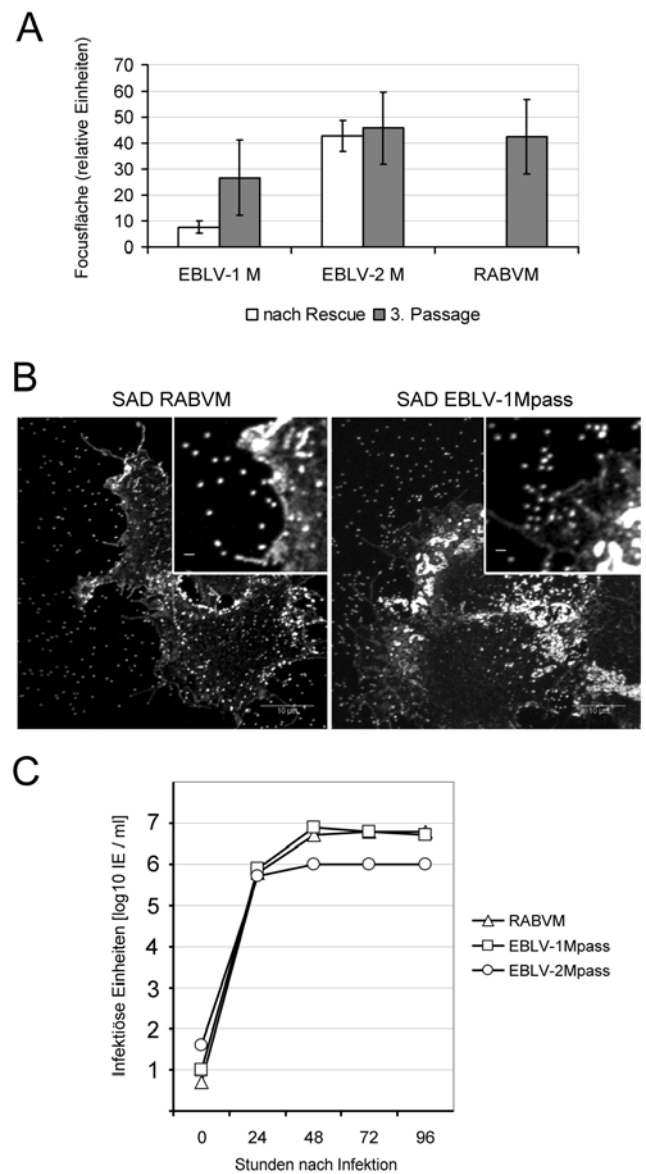


Abb. 2:

Selektion von chimären Viren mit gesteigerter Virusproduktion. (A) Die Ausbreitung der chimären Viren in Zellkulturen wurde direkt nach dem Virus-Rescue und nach drei Viruspassagen auf BSR T7/5 Zellen bestimmt, indem die Flächen von viralen Infektionsherden (Foci) ermittelt wurden (n=10). Während die Ausbreitung von SAD EBLV-2M zu beiden Zeitpunkten mit der des Kontrollvirus SAD RABVM vergleichbar war, konnte für SAD EBLV-1M nach der dritten Viruspassage ein deutlicher Anstieg der Focuströßen ermittelt werden. (B) Die Virusfreisetzung aus SAD EBLV-1Mpass infizierten Zellen konnte mit Hilfe einer G-spezifischen Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Der Maßstabsbalken in den Ausschnittsvergrößerungen entspricht 1 µm. (C)

Wachstumskurven zeigen, dass die Replikation von SAD EBLV-1Mpass mit der des Kontrollvirus SAD RABVM vergleichbar war, während die Titer für SAD EBLV-2Mpass auf einem 10-fach niedrigeren Niveau blieben. (A und C modifiziert nach Fine *et al.*, 2009).

der Aminosäureposition 44 zu einem Austausch von Methionin nach Lysin führte. Während momentan über eine Rolle der mutierten Aminosäure bei der Interaktion mit viralen oder zellulären Proteinen nur spekuliert werden kann, wird in aktuellen Studien die Bedeutung der Mutation M44K für die Funktion des Matrixproteins bei der Virusmorphogenese bzw. bei der Modulation von zellulären Funktionen durch M untersucht.

DARSTELLUNG TYPISCHER RABV MORPHOGENESESTADIEN

Die Escape-Mutante SAD EBLV-1Mpass ermöglichte erstmals vergleichende ultrastrukturelle Untersuchungen zur genotypspezifischen M-abhängigen Lyssavirus-Morphogenese, da das EBLV-1M Protein nur in einer Aminosäure verändert war und die zu vergleichenden Viren zu ähnlichen Virustitern replizierten (Abb. 2B). Bevor vergleichende Experimente mit SAD EBLV-1Mpass und SAD RABVM durchgeführt wurden, wurden zunächst typische RABV- Morphogenesestadien für das genetisch unveränderte RABV SAD L16 elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurden BSR T7/5-Zellkulturen mit SAD L16 Virus infiziert. Nach 46 Stunden wurden die Zellen fixiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Dabei konnten Budding-Prozesse an unterschiedlichen zellulären Membranen und eine für Lyssaviren als typisch geltende Akkumulation von intrazellulären virusähnlichen Strukturen in dilatierten und degranulierten Zisternen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) beobachtet werden (Abb. 3A). Querschnitte von intra-zisternalen virusähn-

lichen Strukturen zeigten, dass es sich um behüllte Strukturen handelte (Abb. 3B). Ein Vergleich mit extrazellulären Viruspartikeln ergab, dass die intra-zisternalen Strukturen mit extrazellulären Viruspartikeln hinsichtlich der inneren Organisation und im Partikeldurchmesser identisch waren (Abb. 3BC). Typische Glykoprotein-Spikes waren allerdings nur auf den extrazellulären Viruspartikeln zu erkennen.

EBLV-1M-ABHÄNGIGE UNTERSCHIEDE IN DER INTRA-ZELLULÄREN AKKUMULIERUNG VON VIRUSÄHNLICHEN PARTIKELN IM RAUEN ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUM

Zum Vergleich wurden Zellen mit SAD EBLV-1Mpass und SAD RABVM infiziert und analysiert. Die Ergebnisse der SAD EBLV-1Mpass infizierten Zellen zeigten, dass der Austausch von RABV M gegen EBLV-1 M zu Veränderungen in der intrazellulären Lokalisation viraler Partikel geführt hatte. Im Gegensatz zu SAD L16 und dem Kontrollvirus SAD RABVM (nicht gezeigt) konnten für SAD EBLV-1Mpass ausschließlich Budding-Prozesse an der Zytoplasmamembran beobachtet werden. Strukturelle Veränderungen des rER waren nicht sichtbar, obwohl deutliche RABV-Einschlusskörperchen auf eine effiziente Virusreplikation hinwiesen. Dies zeigt Unterschiede zwischen den Genotyp 1 und 5 Lyssaviren hinsichtlich der Lokalisation der M-abhängigen Morphogenese auf, die aufgrund der vergleichbaren Replikation von SAD RABVM und SAD EBLV-1M nicht auf eine überschüssige Partikelsynthese und einen damit verbundenen Rückstau mit Knospung in das rER zurückzuführen sind.

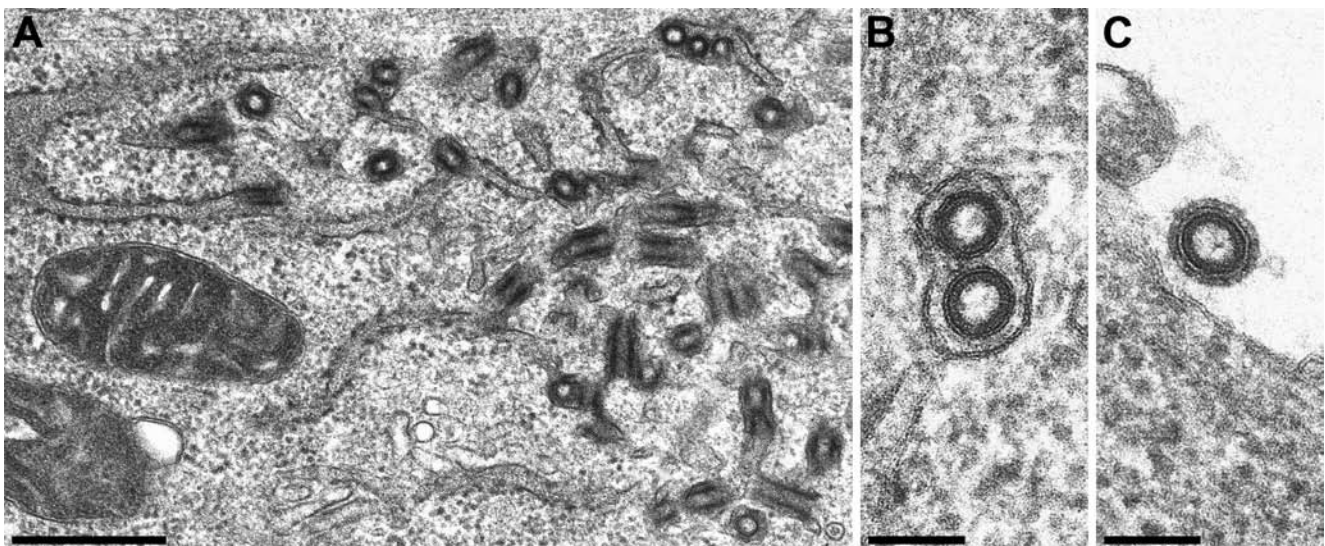
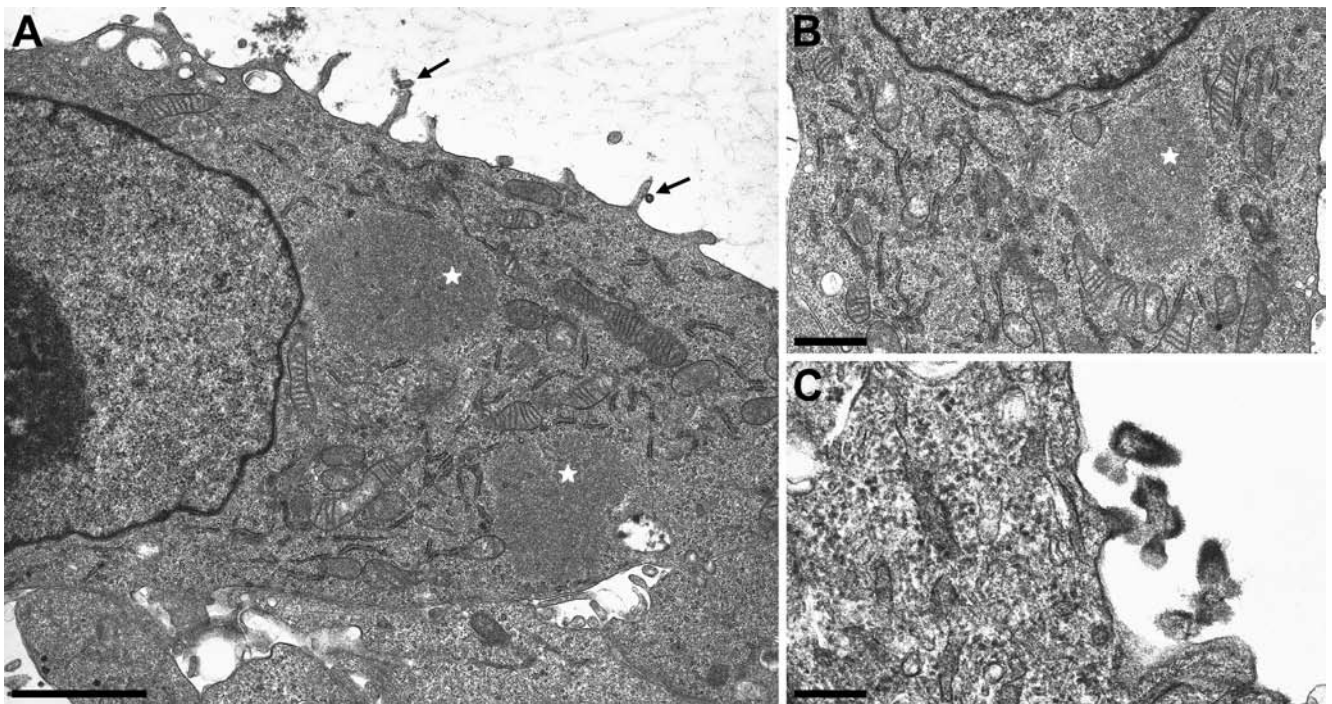


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Darstellung typischer Stadien der RABV Morphogenese. Aufnahmen von RABV infizierten BSR T7/5 Zellkulturen zeigten, dass 46 h nach Infektion sowohl intrazelluläre virusähnliche Partikel als auch extrazelluläre Viruspartikel vorlagen. (A) Virusähnliche Strukturen akkumulierten im dilatierten und degranulierten rER der infizierten Zellen. Maßstabsbalken: 500 nm. (B) Querschnitt einer virusähnlichen Struktur in einer degranulierten rER Zisterne. Maßstabsbalken: 100 nm. (C) Querschnitt eines extrazellulären Viruspartikels. Maßstabsbalken: 100 nm. (aus Finke *et al.*, 2009).

**Abb. 4:**

In SAD EBLV-1Mpass infizierten Zellen akkumulieren keine virusähnlichen Strukturen im rER. Aufnahmen von SAD EBLV-1Mpass infizierten BSR T7/5 Zellkulturen zeigten, dass 46 h nach Infektion keine virusähnlichen Partikel im rER akkumulierten, obwohl virale Einschlusskörper die Infektion der Zelle bestätigten und Virusmorphogenese an der Zytoplasmamembran zu beobachten war. (A) Budding von SAD EBLV-1Mpass an der Zytoplasmamembran (schwarze Pfeile) und virale Einschlusskörper (Sterne) im Zytoplasma der infizierten Zelle. Maßstabsbalken: 2 µm. (B) Viraler Einschlusskörper (Stern) und rER ohne Akkumulierung von intra-zisternalen virusähnlichen Strukturen. (C) Budding an der Plasmamembran und extrazelluläre, geschossförmige Viruspartikel von SAD EBLV-1Mpass. Maßstabsbalken: 250 µm. (aus Finke *et al.*, 2009).

Obwohl die intrazellulären virusähnlichen Strukturen vermutlich nicht zur Produktion infektiöser Viren im Zellkulturüberstand beitragen, kann eine Bedeutung dieser Strukturen für den Neurotropismus und für die Virulenz von Lyssaviren nicht ausgeschlossen werden. Derartige intrazelluläre Akkumulierungen sind typisch für neurotrophe Lyssaviren. Nicht-neurotrophe Rhabdoviren außerhalb des Genus *Lyssavirus* weisen dagegen keine vergleichbaren Phänomene auf. Die einzige Ausnahme bildet das neurotrophe Oita-Rhabdovirus. Obwohl keine experimentellen Daten zur Bedeutung der intrazellulären Strukturen für den Neurotropismus vorliegen, erscheint diese Hypothese attraktiv im Hinblick auf bisher ungeklärte Fragen des intra-neuronalen Langstreckentransportes von neu synthetisierten Viruspartikeln, der nach dem Budding von Viruspartikeln in das rER erfolgen könnte, ohne die Freisetzung von Viruspartikeln in den extrazellulären Raum.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vergleichende Analyse unterschiedlicher Lyssavirus M-Proteine vor einem identischen genetischen Hintergrund ermöglichte die Testung der inter-genotypischen Kompatibilität und die Identifizierung von M-abhängigen Unter-

schieden in der Virusmorphogenese. Während die erfolgreiche Generierung von chimären RABV mit M-Proteinen aus EBLV-1 und EBLV-2 die grundsätzliche Möglichkeit einer inter-genotypischen Komplementierung aufzeigte, deutete die deutlich inhibierte Replikationsfähigkeit der chimären Viren auf Störungen in Genotyp-spezifischen Interaktionen zwischen M und anderen viralen Strukturen hin. Aufgrund des hohen Selektionsdruckes für SAD EBLV-1M konnte bereits nach drei Viruspassagen eine Escape-Mutante selektiert werden, die einen Aminosäureaustausch im M ORF aufwies und vergleichbar mit dem Kontrollvirus SAD RABVM replizierte. Trotz vergleichbarer Wachstumskinetiken zeigte die elektronenmikroskopische Analyse virusinfizierter Zellen, dass SAD EBLV-1Mpass im Gegensatz zu SAD RABVM und anderen RABV keine für neurotrophe Lyssaviren typischen intrazellulären Virus-ähnlichen Strukturen ausbildete, die auf ein Virus-Budding in das raue Endoplasmatische Retikulum hinweisen. Die M-Proteine von EBLV-1 und RABV führen demnach zu einer unterschiedlichen intrazellulären Lokalisation der Virusmorphogenese. Obwohl die Bedeutung der intrazellulären Akkumulierungen für die virale Replikation nicht bekannt ist, deuten die Befunde auf unterschiedliche Interaktionen der M-Proteine mit zellulären Membranen oder Membran-rekrutierenden zellulären Proteinen hin, die möglicherweise einen bedeutenden Einfluss auf die wirts-

abhängige Replikation unterschiedlicher Lyssaviren und/oder deren Pathogenität *in vivo* haben.

Die Verfügbarkeit der chimären Escape-Mutante SAD EBLV-1Mpass ermöglicht nunmehr die weitere Erforschung Genotyp-spezifischer Funktionen von M. Dabei ist vor allem die Identifizierung der zellulären Zielstrukturen für die M-Proteine für ein detailliertes Verständnis der molekularen Mechanismen der Virusmorphogenese, der Genotyp-spezifischen Unterschiede und deren Einfluss auf die wirtsabhängige Replikation von großer Bedeutung.

LITERATUR

- FINKE, S. and K. K. CONZELMANN. 2003. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *J Virol* 77:12074-12082.
- Finke, S., H. Granzow, J. Hurst, R. POLLIN, and T. C. METTENLEITER. 2009. Inter-genotypic Replacement of Lyssavirus Matrix Proteins Demonstrates Role of Lyssavirus M Proteins Intracellular Virus Accumulation. *J Virol* [Epub ahead of print 2 Dec 2009, 10.1128/JVI.01665-09]
- FINKE, S., R. MUELLER-WALDECK, and K. K. CONZELMANN. 2003. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J Gen Virol* 84:1613-1621.
- MEBATION, T., M. KONIG, and K. K. CONZELMANN. 1996. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell* 84:941-951.
- MEBATION, T., F. WEILAND, and K. K. CONZELMANN. 1999. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol* 73:242-250.

Institut für Virusdiagnostik (IVD)

KLASSISCHE SCHWEINEPEST BEIM WILDSCHWEIN: DIAGNOSTIK, MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE UND PATHOGENESE IM KONTEXT DER AKTUELLEN KSP-SITUATION

Blome, S.¹, Staubach, C.², Strebelow, G.¹, Beer, M.¹

¹Institut für Virusdiagnostik, ²Institut für Epidemiologie

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine weltweit vorkommende, verlustreiche Tierseuche mit großer handelspolitischer und ökonomischer Relevanz. Sie betrifft ausschließlich Haus- und Wildschweine und wird durch ein kleines, behülltes RNA-Virus aus dem Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae* hervorgerufen (KSPV). Die KSP war und ist in den Wildschweinpopulationen einiger europäischer Länder endemisch und stellt eine ernstzunehmende Bedrohung für benachbarte Haus Schweinebestände dar. Es konnte gezeigt werden (Fritzemeier *et al.*, 2000), dass ca. 60 Prozent der KSP-Primärausbrüche auf direkte und indirekte Kontakte mit infizierten Wildschweinen zurückzuführen sind, weshalb die KSP auch in Wildschweinbeständen streng bekämpft wird. In Deutschland gab es in den vergangenen Jahren immer wieder Ausbrüche in der stetig zunehmenden Wildschweinpopulation, die mit Hilfe der oralen Immunisierung eingedämmt werden konnten. Impfkampagnen in Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz dauern z. T. auch noch an. Da die prophylaktische Impfung gegen die KSP innerhalb der EU verboten ist, geschahen diese Maßnahmen auf Grundlage eines von der EU genehmigten Notimpfplans. Im Jahr 2008 war die Bundesrepublik Deutschland erstmals wieder frei von KSP in der Wildschweinpopulation, 2009 ist es jedoch schon wieder zu umfangreichen Ausbrüchen bei Wildschweinen gekommen.

AKTUELLE SITUATION

Bedauerlicherweise ergab bereits die KSP-Surveillance im vierten Quartal des Jahres 2008 positive Antikörperbefunde in den rechtsrheinischen Gebieten von Rheinland-Pfalz (Kreise Neuwied und Altenkirchen), die nach einem ersten positiven Virusnachweis im Januar 2009 in Nordrhein-Westfalen von weiteren Virusnachweisen in Rheinland-Pfalz gefolgt wurden. Der erste positive Virusnachweis gelang aus dem Probenmaterial eines in Rösrath geschossenen Frischlings, der durch verändertes Verhalten auffällig geworden war. Insgesamt wurden bisher 28 Fälle in Nordrhein-Westfalen und 16 Fälle in Rheinland-Pfalz diagnostiziert. Das betroffene Gebiet mit den eingerichteten Restriktions- und Impfgebieten ist in Abbildung 1 dargestellt.

Von diesem Geschehen unabhängig wurden im März 2009 links des Rheins im südlichen Rheinland-Pfalz, im Land-

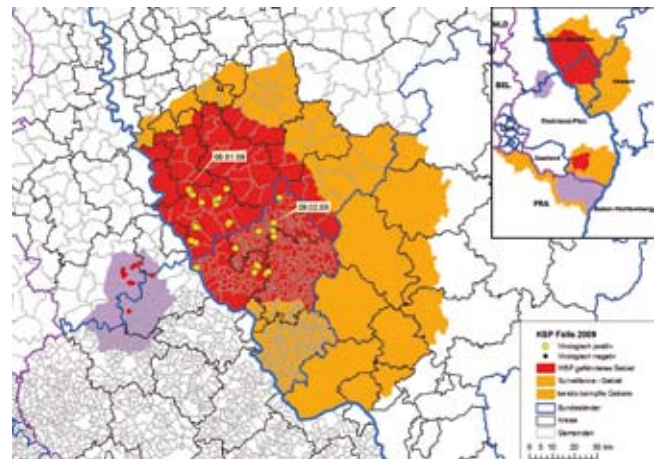


Abb. 1:
Ausbruchsgeschehen in NRW und RP, rechtsrheinisch (Stand 06.11.2009).

kreis Pirmasens, virologisch positive Fälle festgestellt. Die Gesamtzahl der Fälle beläuft sich dort auf acht Nachweise. Eine Gebietsdarstellung findet sich in Abbildung 2.

Die Bekämpfungsmaßnahmen schlossen erneut die orale Immunisierung mittels drei Doppelauslagen von Impfködemern pro Jahr ein. Im Umkreis der Impfgebiete wird die gesamte Jagdstrecke beprobt und einer serologischen und virologischen Untersuchung zugeführt. Des Weiteren werden alle verendeten oder krank angesprochenen Wildschweine

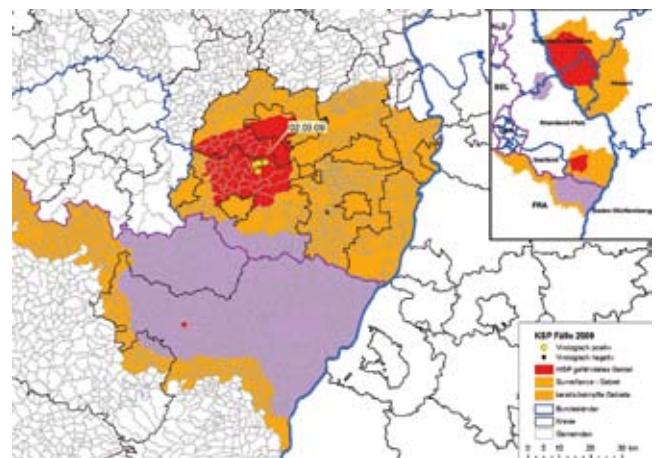


Abb. 2:
Ausbruchsgeschehen in RP, linksrheinisch (Stand 06.11.2009).

überprüft. Im übrigen Gebiet findet eine altersabhängige Stichprobenuntersuchung der Jagdstrecke statt. Von herausragender Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die internationale Wildschweindatenbank, die vom Institut für Epidemiologie des FLI maßgeblich betreut wird. Sie gestattet nicht nur die georeferenzierte Erhebung und Pflege aller relevanten Daten zu allen untersuchten Wildschweinen, sondern lässt auch retrospektive Analysen und Risikobewertungen zu.

DIAGNOSTIK

Da das klinische Bild sehr variabel sein kann und bei betroffenen Wildschweinen selten festzustellen ist, müssen zur Bestätigung der Erkrankung stets labor diagnostische Methoden verwendet werden. Für die Diagnostik der KSP beim Schwarzwild stehen grundsätzlich die gleichen Tests zu Verfügung, die auch beim Hausschwein Anwendung finden. Die Methoden der Wahl sind der Antikörper-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) und die *real-time* RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*). Nahezu flächendeckend findet hierzu die von Hoffmann *et al.* 2005 entwickelte *real-time* RT-PCR Anwendung. Für dieses System konnte die hervorragende Eignung für Wildschweineproben bereits im Jahr 2006 durch Depner *et al.* gezeigt werden.

Für weiterführende Untersuchungen und zur Bestätigung von Testresultaten stehen zellkulturbasierte Verfahren wie Virusisolierung und Neutralisationstests sowie molekularbiologische Techniken wie die partielle oder vollständige Sequenzierung zur Verfügung. Des Weiteren können Kryoschnitte mit Fluoreszenz- oder Peroxidase-markierten Antikörpern direkt untersucht werden. Obwohl es keine biologischen Unterschiede im Probenmaterial von Haus- und Wildschweinen gibt, sind Wildschweineproben in der Regel besonders heikel. Dies liegt vor allem an der Qualität der Proben, die nicht selten im Zustand beginnender Verwesung im Labor eintreffen. Derartige Proben sind für alle Testverfahren, speziell jedoch für die Zellkultur, als problematisch einzustufen.

Im Rahmen der Untersuchungen zu den oben genannten Ausbruchsgeschehen wurden am Nationalen Referenzlabor (NRL) für KSP bis November 2009 79 Proben mit positivem Vorbericht aus unterschiedlichen Landesuntersuchungsämtern bearbeitet. Es handelte sich insbesondere um virologische Abklärungen und Sequenzierungen. Darüber hinaus wurden Antikörperfunde in angrenzenden Gebieten abgeklärt.

Durch die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden ist das PCR-Testsystem für die KSP sehr sensitiv geworden. Einerseits ist dies eine wünschenswerte Entwicklung, andererseits führt dies auch zum Nachweis von Impfvirus in Gebieten mit oraler Immunisierung beim Schwarzwild. Am

NRL für KSP wurden im Jahr 2009 23 C-Stamm-Nachweise mittels PCR und Sequenzierung erbracht. Um diesem Problem zu begegnen, wurde am NRL für KSP eine multiplex *real-time* RT-PCR entwickelt, welche den KSPV-Nachweis und die Unterscheidung zwischen Feldviren und dem Impfvirus „C-Stamm Riems“ in einem Ansatz zulässt (Leifer *et al.*, 2009). Somit kann eine schnelle Differenzierung von infizierten und vakzinierten Tieren erfolgen (genetisches DIVA-Prinzip, engl. *differentiating infected from vaccinated animals*; Beer *et al.*, 2007). Die PCR wurde in die Routinediagnostik eingebunden und erbrachte zunächst sehr gute Übereinstimmungen mit der nachfolgenden Sequenzierung. Im Laufe der intensiven Nutzung an diagnostischen Proben traten jedoch Fälle auf, in denen es zu Diskrepanzen zwischen PCR und Sequenzierung kam. Bei der folgenden Analyse konnte gezeigt werden, dass Sequenzunterschiede im Impfstoff bzw. in der Probe zu diesem Problem führten. Um dies zu beheben, wurde das System entsprechend angepasst. Das neue System befindet sich nun nach einer erneuten Validierung in der Routinediagnostik. Die Änderung führte allerdings dazu, dass der Test nicht mehr C-Stamm-spezifisch, sondern Genotyp-spezifisch (1.1) ist. Für die momentane KSP-Situation, in der Ausbrüche in Europa ausschließlich durch Viren des Genotyps 2 verursacht werden, ist diese Einschränkung tragbar.

MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE

Die molekulare Epidemiologie stützt sich auf die Analyse des Virusgenoms und ist ein Hilfsmittel, um die räumlichen und zeitlichen Zusammenhänge eines Seuchenausbruchs besser zu verstehen. Zur Klassifizierung von KSPV-Isolaten werden bisher vorrangig zwei kurze Genomabschnitte aus der 5'-nicht-translatierten Region (5'-NTR) bzw. dem E2-Gen des KSPV sequenziert. Auf dieser Basis lassen sich die Viren in drei Genotypen (1-3) mit jeweils drei bis vier Subtypen einteilen. Die 5'-NTR-Sequenzen werden zur weiteren Unterscheidung herangezogen. Dies geschieht auf regionaler Ebene vor allem für Virusstämme des Genotyps 2.3. Die Sequenzdaten werden in der Datenbank des EU-Referenzlabors (CRL) für KSP in Hannover gesammelt und stehen zu Vergleichszwecken zur Verfügung. Traditionell bekamen die charakterisierten Isolate am CRL die Namen der primären Fundorte. So entstanden die Benennungen 2.3 Uelzen, 2.3 Rostock, 2.3 Güstrow etc.. Obwohl diese Namen ursprünglich für den internen Gebrauch am CRL bestimmt waren, haben sie sich EU-weit eingebürgert und auch in die Beschreibungen von Ausbruchsgeschehen beim Wildschwein in Deutschland Eingang gefunden. So sprach man bei den Virusstämmen aus der Eifel und Nordrhein-Westfalen von 2.3 Rostock, bei denen aus der Pfalz von 2.3 Uelzen.

Das erste KSPV-Isolat aus dem Jahr 2009 („Rösrath“) zeigte geringfügige, aber eindeutige Unterschiede zu Virusstäm-

men des Genotyps 2.3, die bis 2007 in der Region Euskirchen (NRW, linksrheinisch) gefunden wurden. Diese Virusstämme waren der Variante 2.3 Rostock zugeordnet. Weder in der nationalen Datenbank noch in der Sequenzdatenbank am CRL in Hannover konnten völlig identische Isolate gefunden werden, auf Ebene der 5'-NTR brachte das Isolat sowohl Merkmale von 2.3 Rostock als auch von 2.3 Uelzen mit. Aus diesem Grund wurde zu diesem Zeitpunkt ein Neueintrag der KSP nicht ausgeschlossen. Im weiteren Verlauf des Seuchengeschehens wurden Wildschweine gefunden, die einen geringfügig anderen Virustyp (Hennef) trugen. Die Genotypisierung ergab, dass diese Isolate zu 100 Prozent mit früheren Stämmen aus der Region Euskirchen identisch waren. Ein vereinfachter phylogenetischer Baum, basierend auf der phylogenetischen Analyse des E2-Fragments, ist in Abbildung 3 dargestellt. Die nachfolgenden Untersuchungen schlossen erstmals die Analyse des Gesamtgenoms dieser Stämme mit ein. Es zeigte sich dabei, dass sie sehr nahe miteinander verwandt sind und charakteristische Gemeinsamkeiten aufweisen, die sich nicht in der Variantenbezeichnung 2.3 Rostock bzw. Uelzen fassen lassen. Insbesondere fanden sich Sequenzmuster, die sich von anderen verwandten Virustypen unterscheiden. Somit existieren Hinweise, dass die Stämme einen gemeinsamen Vorfahren haben und als Quasispezies anzusprechen sind. Bis heute sind weitere verwandte Varianten aufgetreten, die dieses Muster ebenfalls tragen. Die traditionelle Genotypisierung war also in diesem Falle irreführend und sollte überdacht werden. In Zusammenarbeit mit dem CRL für KSP wird die Nomenklatur der Virusstämme zurzeit angepasst. Es wird vorgeschlagen, die irreführenden, historischen Bezeichnungen aufzugeben, und dafür eine einheitliche Benennung nach folgendem Muster vorzunehmen: Virus, Genotyp, Wirtsspezies, Datenbanknummer am CRL, Jahr der Isolierung und Ort des ersten Auftretens. Eine neue Bezeichnung sollte dabei Prototypen vorbehalten bleiben, die sich von bereits erfassten Stämmen unterscheiden. Für das in Rösrath isolierte Virus hieße dies: *CSFV/2.3/wb/CSF1045/2009/Roesrath*.

Es ist nach wie vor unklar, wann und wie es dazu kam, dass das Virus den Rhein überquerte. Die Untersuchungsdichte in der Region Euskirchen war zum fraglichen Zeitpunkt sehr hoch, so dass es nicht sehr wahrscheinlich ist, dass eine bedeutende Virusprävalenz in dieser Region unentdeckt blieb. Rechtsrheinisch wurden ebenfalls Untersuchungen durchgeführt, allerdings in sehr viel geringerer Zahl.

Das zweite Ausbruchsgeschehen in der Region um Pirmasens wurde durch einen KSPV-Stamm verursacht, der zu 100 Prozent mit früheren Isolaten aus der Region identisch war (Genotyp 2.3 Uelzen/Bas Rhin). Bisher ist unklar, ob das Virus latent in der Region persistierte oder aus den umliegenden Gegenden wieder eingeschleppt wurde.

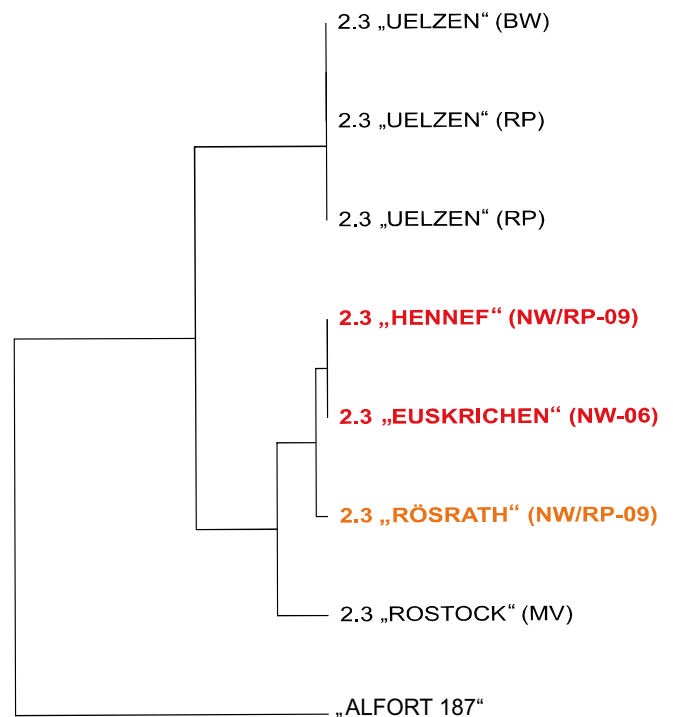


Abb. 3:
Phylogenetische Analyse des E2-Fragments (vereinfachte Darstellung) der isolierten KSPV-Isolate.

BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG UND PATHOGENESE

Um die Frage zu klären, wie sich dieses neue Virusisolat in Haus- und Wildschweinen verhält, und um Referenzmaterial zu gewinnen, wurden die in Rösrath (NRW) und Hennef (NRW) isolierten Viren in zwei Tierexperimenten biologisch charakterisiert.

In dem ersten Tierexperiment im L3-Stall des FLI wurden jeweils sechs junge Mastschweine (Gewicht je ca. 30 kg) mit den Stämmen aus „Rösrath“ bzw. „Hennef“ infiziert und mit jeweils drei Kontakttieren gehalten. Körpertemperatur und Klinik wurden täglich erhoben. Zum Ende des Versuchs wurde Referenzmaterial für PCR und andere diagnostische Tests gesammelt. Im Rahmen dieses Versuches zeigten alle Tiere nach einer Inkubationszeit von vier bis elf Tagen Fieber und unspezifische klinische Symptome wie Appetitlosigkeit, Schniefen, Husten, Diarrhoe und die Tendenz, übereinander zu liegen. Von den Tieren, die mit dem Isolat aus Hennef infiziert wurden, verstarben drei Tiere zwischen dem 22. und 24. Tag nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Tiere deutliche Anzeichen für KSP (Zyanose, Blutungen, zentralnervöse Symptome). In der Gruppe, die mit dem Virusisolat aus Rösrath infiziert wurde, starben vier direkt infizierte Tiere und ein Kontakttier zwischen dem 28. und 35. Tag nach der Infektion. Diese Tiere zeigten wieder

deutliche KSP-Symptome. In den folgenden pathologisch-anatomischen Untersuchungen wurden ebenfalls deutliche KSP-Symptome gefunden. Alle bis auf eines der überlebenden Tiere entwickelten hohe Titer neutralisierender Antikörper. Das Tier, das keine hohen Antikörpertiter entwickelte, zeigte Anzeichen einer chronischen KSP-Erkrankung, konnte jedoch nicht weiter verfolgt werden.



Abb. 4: Klinische Symptome nach Infektion mit dem in Rösraath isolierten KSPV-Isolat.

Im zweiten Experiment ging es primär um die Frage, ob sich Klinik und Pathologie bei Haus- und Wildschweinen unterscheiden. Zu diesem Zweck wurden fünf Absatzferkel und fünf Wildschweinfrischlinge mit dem Isolat aus Rösraath infiziert. Regelmäßig wurden Blut- und Tupferproben entnommen sowie der klinische Status erhoben. Wiederum wurden Referenzmaterialien gewonnen, die nun für die Diagnostik zur Verfügung stehen. Nach einer Inkubationszeit von drei bis sieben Tagen entwickelten alle Tiere Fieber und unspezifische Symptome (siehe oben). Generell



erkrankten die Wildschweine etwas eher, subjektiv jedoch mit etwas weniger Symptomen (siehe Abbildung 5). Drei der Hausschweine und vier der Wildschweine verstarben, wobei die Hausschweine deutliche KSP-Symptome aufwiesen. Vor allem bei den Wildschweinen kam eine bakterielle Sekundärinfektion des Darmes hinzu. Die anschließende Sektion zeigte bei den Wildschweinen eine überschießende Wurminfestation sowie eine diphtheroid-nekrotisierende (Typhlo-)Colitis. Die überlebenden Tiere entwickelten Antikörper und gesundeten vollständig.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Diagnostik der KSP beim Wildschwein ist auch aufgrund der Weiterentwicklungen der letzten Zeit (z. B. *multiplex real-time* RT-PCR) gut aufgestellt und wird durch die Pflege der internationalen Wildschweindatenbank unterstützt. Die neu entwickelte *multiplex real-time* RT-PCR lässt eine Differenzierung geimpfter und infizierter Tiere auf genetischer Ebene zu und leistet einen wichtigen Beitrag zu einer verlässlichen Diagnose.

Bei den Untersuchungen zur molekularen Epidemiologie der Wildschweinepest in Rheinland-Pfalz und Nordrhein-Westfalen zeichnete sich ab, dass die historische Benennung der Stämme irreführend sein kann und durch eine neue, neutralere Charakterisierung und Benennung ersetzt werden sollte. Zu diesem Zweck erfolgt eine enge Zusammenarbeit mit dem gemeinschaftlichen Referenzlabor in Hannover.

Für die biologische Charakterisierung der Virusstämme kann man zusammenfassend sagen, dass die getesteten Viren bezüglich Inkubationszeit und Klinik alle Charakteristika virulenter Virusstämme zeigten. Neben vorwiegend unspezifischen Symptomen und schweren Sekundärinfektionen des Gastrointestinaltraktes traten regelmäßig auch typische Anzeichen wie Hautblutungen und zentralnervöse Symp-



Abb. 5: Klinische Symptome bei Haus- und Wildschweinen nach einer Infektion mit dem in Rösraath isolierten KSPV.

tome auf. Bei der Infektion von jungen Läufer Schweinen mit dem Isolat aus Rösrath betrug die Mortalität 60 Prozent, bei Wildschweinen gleichen Alters 80 Prozent. Ältere Schweine zeigten über lange Zeit unspezifische Symptome (bis zu 20 Tage) bis sie entweder gesunden oder mit deutlichen Symptomen verstarben. Alle überlebenden Schweine entwickelten neutralisierende Antikörper und schieden kein Vi-

rus mehr aus. Zur Übersicht der zu erwartenden Symptome wurden die Verläufe in Abbildung 6 zusammengefasst. In jedem Falle müssen klinisch kranke Schweine, insbesondere wenn Fieber vorliegt und weitere Symptome (siehe Abbildung 6) anzutreffen sind, differentialdiagnostisch auch auf KSP untersucht werden.

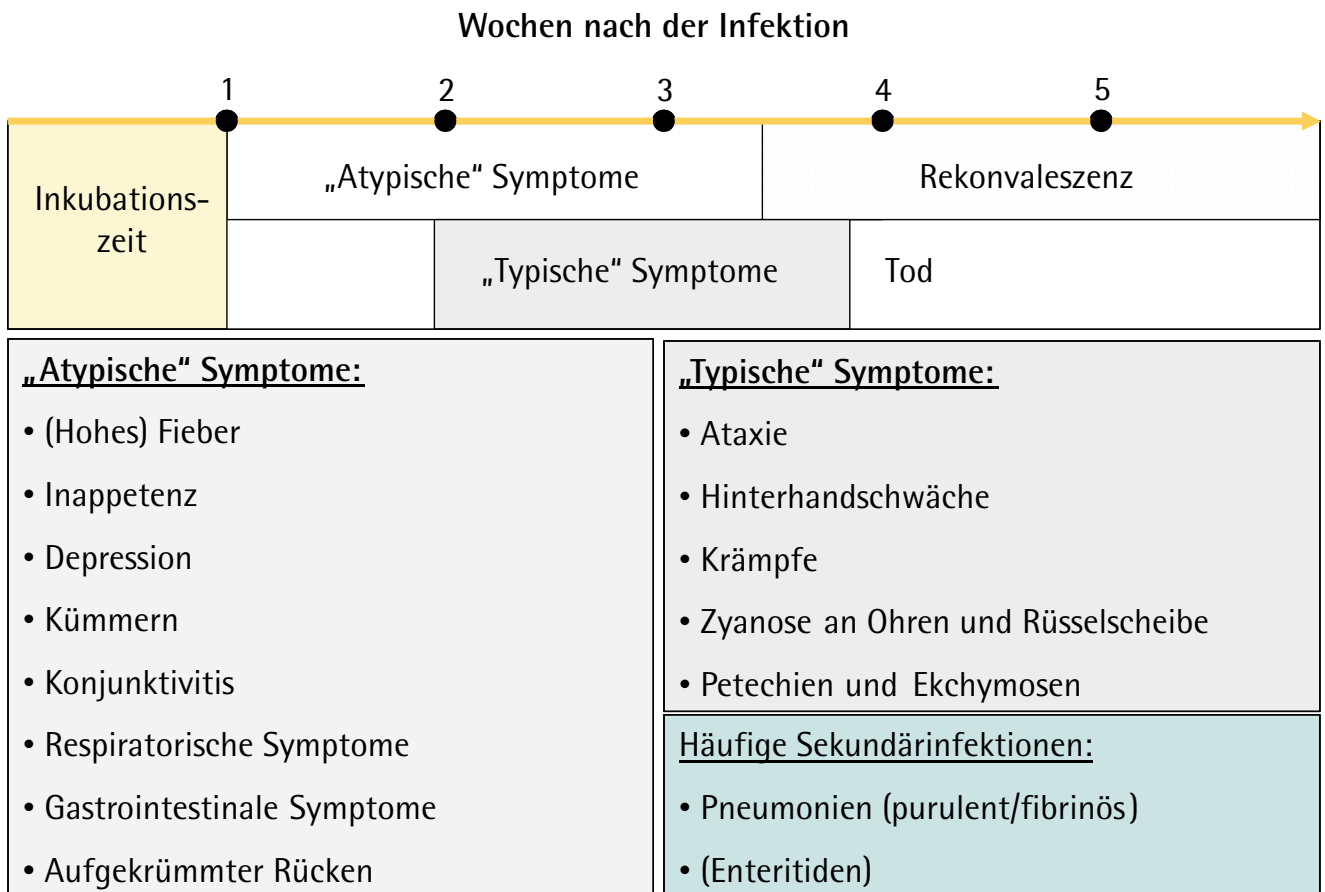


Abb. 6:
Klinischer Verlauf der akuten Erkrankung mit aktuellen KSPV-Stämmen.

LITERATUR

- BEER, M., I. REIMANN, B. HOFFMANN, AND K. DEPNER. 2007. Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine* 25:5665-5670.
- DEPNER, K., C. BUNZENTHAL, B. HEUN-MÜNCH, G. STREBELOW, B. HOFFMANN, AND M. BEER. 2006. Diagnostic evaluation of a *real-time* RT-PCR assay for routine diagnosis of classical swine fever in wild boar. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53:317-20.
- FRITZEMEIER, J., J. TEUFFERT, I. GREISER-WILKE, C. STAUBACH, H. SCHLÜTER, AND V. MOENNIG. 2000. Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol* 77:29-41.
- HOFFMANN, B., M. BEER, C. SCHELP, H. SCHIRRMAYER, AND K. DEPNER. 2005. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 130:36-44.
- LEIFER, I., K. DEPNER, S. BLOME, M.F. LE POTIER, M. LE DIMNA, M. BEER, AND B. HOFFMANN. 2009. Differentiation of C-strain „Riems“ or CP7_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using *real-time* RT-PCR. *J Virol Methods* 158:114-22.

Institut für Infektionsmedizin (IMED)

INFLUENZA A/H1N1/2009 BEIM SCHWEIN: AKTUELLE SITUATION, TIEREXPERIMENTELLE STUDIEN UND INTERPRETATIONEN

Lange, E., Deckers, D., Vahlenkamp, T.W.

Inflenzaviren gehören zu der Familie der *Orthomyxoviridae* und besitzen ein segmentiertes RNA-Genom negativer Polarität. Human- und veterinärmedizinisch relevante Vertreter werden genetisch und antigenetisch dem Genus Influenza A Virus zugeordnet. Anhand der Kombination der zwei Hauptantigene Hämagglutinin und Neuraminidase werden diese weiter in Subtypen klassifiziert (Easterday *et al.*, 1997). Serologisch werden sechzehn verschiedene Hämagglutinin- und neun Neuraminidase-Subtypen unterschieden. Mutationen bei Inflenzaviren führen häufig zum Austausch einzelner Aminosäuren. Liegen Punktmutationen im Bereich antigener Epitope vor, wird der Vorgang als „antigenic drift“ bezeichnet. Die Entstehung von Reassortanten mit einer neuen Zusammenstellung der Gensegmente nach gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit unterschiedlichen Inflenzaviren wird als „antigenic shift“ bezeichnet.

INFLUENZA A/H1N1/2009

Im April 2009 wurden Inflenzavirusinfektionen bei Patienten in Mexiko und den USA nachgewiesen, die durch ein bislang nicht beschriebenes Inflenzavirus A/H1N1/2009 verursacht wurden. Sequenzanalysen zeigten, dass das Genom des Virus Gensegmente aviären, humanen und porzinen (nordamerikanischer und eurasischer Stämme) Ursprungs aufwies (Cohen, 2009; Garten *et al.*, 2009). Die Sequenzen mit größter Homologie (94 bis 97 Prozent) stammen je nach Gensegment von porzinen Inflenzaviren aus den Jahren 1992 bis 2004. Die Herkunft der neuen Reassortante ist nach wie vor ungeklärt, auch wenn Analysen des pandemischen Virus und seiner engsten Verwandten vermuten lassen, dass es bereits gewisse Zeit unentdeckt zirkulierte (Smith *et al.*, 2009). Die ersten in Mexiko und den USA aufgetretenen Infektionen hängen nach Informationen der Weltgesundheitsorganisation WHO und der betroffenen Länder nicht unmittelbar mit dem Kontakt zu infizierten Schweinen zusammen. Da die Hämagglutinin- und Neuraminidase-Gene von nordamerikanischen bzw. eurasischen porzinen Inflenzaviren stammen, ist jedoch anzunehmen, dass das Schwein bei der Reassortierung eine Rolle gespielt hat.

Momentan zirkuliert das Inflenzavirus A/H1N1/2009 weltweit in der Bevölkerung. Die WHO hat aufgrund der Vielzahl an Erkrankungen am 11.06.2009 die Vorsorge- und Kontrollmaßnahmen auf den höchsten Pandemiegrad an-

gehoben. Generell zeigen die Infektionen einen klinisch milden Verlauf und sprechen auf die eingeleiteten Therapien mit Neuraminidase-Inhibitoren gut an. Mittlerweile gibt es ebenfalls Berichte aus 20 Ländern, u. a. aus Amerika (Kanada, Argentinien, USA), Australien, Asien (Singapore, Japan) und Europa (Norwegen, Irland, Vereinigtes Königreich, Italien, Deutschland), die Übertragungen des Virus auf Schweine und z. T. auch von Schweinen zu Menschen beschreiben. Aus vier Ländern sind Infektionen in Putenbeständen gemeldet worden (Tabelle 1). Darüber hinaus wurden mehrfach Infektionen bei Hunden, Katzen und Frettchen beschrieben (Internationale Organisation für Tiergesundheit OIE, www.oie.org).

PORZINE INFLUENZA

Influenza beim Schwein ist eine akute Infektionskrankheit der Atmungsorgane und eine der häufigsten viralen respiratorischen Infektionen bei dieser Tierart, die bei allen Altersgruppen auftritt. Sie wurde erstmals 1918 als eine offensichtlich neue Krankheit in Schweinebeständen des Mittleren Westens der USA beobachtet (Shope, 1931). Die Übertragung erfolgt in der Regel aerogen, kann aber auch durch kontaminierte Gegenstände und Personen, die mit infizierten Schweinen in Berührung gekommen sind, erfolgen. Nach Infektion findet die Virusvermehrung lokal in Epithelzellen der Bronchien und Bronchiolen sowie in den Alveolargängen und den Alveolen der Lunge statt. Die Freisetzung neugebildeter Viruspartikel aus infizierten Zellen erfolgt bereits fünf bis sechs Stunden nach Infektion (Döhner, 1987). Klinische Symptome treten nach einer zwei- bis viertägigen Inkubationszeit auf. Die Tiere zeigen Inappetenz, Apathie und deutlich erhöhte Körpertemperatur (bis 42°C). Je nach Schweregrad können zusätzlich Atembeschwerden, verstärkte Flankenatmung, in schweren Fällen Maulatmung und trockener Husten beobachtet werden. Häufig geht die Infektion mit Entzündungen der Nasen- und Lidbindehäute (Rhinitis, Konjunktivitis) einher. Bei guten hygienischen Verhältnissen und ohne Komplikationen durch sekundäre bakterielle oder virale Erreger kommt es innerhalb von sieben Tagen zur Rekonstitution. Infektionen treten verteilt über das ganze Jahr auf und zeigen keine saisonale Häufung. Epidemiologisch sind Infektionen mit Viren des Subtyps H1N1 beim Schwein weit verbreitet (klassisches H1N1 in Amerika, avian-like H1N1 in Europa, klassisches und avian-

Länder	Berichtsdatum bei der OIE oder EU	Spezies (Anzahl der Ausbrüche)	Ort (Anzahl der Betriebe)
Kanada	OIE 02/05/09	Schwein (mehrere)	Clearwater Country, Alberta (2)
	OIE 23/10/09	Pute (1)	Waterloo-Wellington Country, Ontario (1)
Argentinien	OIE 25/06/09	Schwein (2)	San Andrés de Giles, San Andrés de Giles, Buenos Aires (1) Cañuelas, Cañuelas, Buenos Aires (1)
Australien	OIE 31/07/09	Schwein (1)	Central West New South Wales, New South Wales (1)
Chile	OIE 21/08/09	Pute (2)	Las Palmas, Quilpue, Valparaíso (1) Pucalán, Quillota, Nogales, Valparaíso (1)
Japan	OIE 21/10/09	Schwein (1)	Osaka (1)
Taiwan	OIE 05/11/09	Schwein (1)	Guanshan township, Tai-Tung (1)
China	OIE 19/11/09	Schwein (1)	Schlachthof der Stadt Shuangcheng, Provinz Heilongjiang
Indonesien	OIE 26/11/09	Schwein (1)	Indotirta Suaka, Bulan Island, Batam, Kepulauan Riau (1)
USA	OIE 30/11/09	Pute (mehrere)	Virginia (1)
Mexico	OIE 07/12/09	Schwein (1)	Querétaro, Colon, Queretaro (1)
Thailand	OIE 17/12/09	Schwein (1)	Thap Kwang, Kaeng, Khol, Saraburi (1)
Korea	OIE 23/12/09	Schwein (16)	weit verbreitet
Russland	OIE 24/12/09	Schwein (1)	Shienerposi, Cheboksarsky, Republik Chuvashkaya (1)
Großbritannien	OIE und EU 18-23/09/09 23/10/09 04-22/12/09	Schwein (7)	Greenhil, County Tyrone (1), Cookstown, County Tyrone (1), Bellaghy, County Londonderry (1), County Down, Newry (1), County Tyrone, Gastledearg (1), Norfolk, (2)
Irland	EU 29/09/09	Schwein (2)	Kilmore, Cavan (1), Kilworth, Cork (1)
Deutschland	EU 21-26/11/09	Schwein (1)	Rheinland-Pfalz (1)
Italien	OIE und EU 27/11/09 u. 22/12/09 22/12/09	Schwein (2) Katze (1)	Nerviano, Provinz Mailand (1) Sizilien (1) Emilia Romagana
Finnland	EU 30/11/09	Schwein (1)	Länsi – Suomi (Teuva) West Finnland (1)
Norwegen	OIE und EU 10/10/09	Schwein (ca. 80)	12 von 19 Regionen betroffen
Island	OIE und EU 27/10/09	Schwein (1)	Gullbringu, Minni Vatnsleysa (1)

Tabelle 1: Influenza H1N1/2009 Infektionen bei Schweinen und Puten im Jahr 2009

like H1N1 in Asien). In Europa sind in den letzten Jahrzehnten Infektionen mit den Subtypen H3N2 und H1N2 hinzugekommen. Diese Viren wurden ursprünglich von Menschen auf Schweine übertragen und konnten nach Reassortierung und Integration von Gensegmenten der avian-like H1N1 Viren stabile Infektionsketten in der Schweinepopulation bilden. Aufgrund der divergenten Evolution der Influenzaviren beim Mensch und Schwein ist das Haemagglutinin des Subtyps

H1N2 nicht mehr kreuzreaktiv zu dem des Subtyps H1N1. In der Schweinepopulation Nord-Amerikas vollzog sich in den letzten zehn Jahren eine rasante Entwicklung, welche nach zahlreichen Einträgen von aviären und humanen Influenzaviren zu neuen Mehrfachreassortanten führte, die sich in ihrer Genzusammenstellung von den Viren in der europäischen Schweinepopulation unterscheiden.

Serologische Untersuchungen in Deutschland, bei denen in den Jahren 2007 bis 2009 über 15.400 Seren aus 1.658 Schweinebeständen untersucht wurden ergaben, dass 65 Prozent der Bestände Antikörper gegen Viren des Subtyps H1N1, 59 Prozent der Bestände Antikörper gegen H3N2 und 35 Prozent gegen H1N2 besaßen. Insgesamt konnten in lediglich 23 Prozent der Bestände keine Influenzavirus-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. In Gebieten mit hoher Schweinedichte war der Nachweis aller drei Subtypen in Beständen sehr häufig. In den anderen Gebieten überwog der Subtyp H1N1 (Dürwald *et al.*, 2010). Bei epidemiologischen Untersuchungen im zentralen Norden der USA wurden bei 22,8 Prozent aller Schweine Antikörper gegen Influenzaviren des Subtyps H1 bzw. H3 festgestellt. Von 480 erhaltenen Isolaten gehörten 67,1 Prozent dem Subtyp H1N1, 26,9 Prozent dem Subtyp H3N2 und 4,6 Prozent dem Subtyp H1N2 an (Choi *et al.*, 2002).

IMPfstoffe

Impfungen gegen Influenza beim Schwein werden in Europa und in den USA erfolgreich eingesetzt. Die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Impfungen werden insbesondere in Sauenbeständen eingesetzt, um u. a. die Ferkel durch maternale Antikörper in den ersten Lebenswochen vor einer Infektion zu schützen. Nach der sechsten bis achten Lebenswoche endet dieser Schutz und die Tiere sind empfänglich für die Infektion. Meist werden bei immunisierten Tieren nur geringe oder gar keine Symptome nach Infektion beobachtet. Bei nicht geimpften Tieren kann die Erkrankungshäufigkeit in einem Bestand bis zu 100 Prozent erreichen.

Gegen Infektionen von Schweinen mit dem neuen Influenzavirus A/H1N1/09 ist in Europa noch kein Impfstoff erhältlich. In den USA wurde der Firma Pfizer für einen A/H1N1/2009-spezifischen Impfstoff bei Schweinen eine „conditional licence“ erteilt. Gegenwärtig gibt es keine Möglichkeit geimpfte Schweine von natürlich infizierten Schweinen zu unterscheiden, da in beiden Fällen die gleichen Antikörper gebildet werden.

Erkrankte Schweine können mit Medikamenten gegen auftretende Symptome wie Fieber behandelt werden.

ÜBERTRAGUNG AUF MENSCHEN

Humane Infektionen mit den bei Schweinen endemisch vorkommenden Influenzaviren sind selten, aber in den vergangenen Jahren wiederholt beschrieben worden. Bislang waren dies - mit Ausnahme einer Infektion mit porzinen Influenzaviren des Subtyps H1N1 im Jahre 1976 in den USA - alles Infektionen, die keine weiteren Infektionsketten in der Bevölkerung nach sich zogen. Der letzte dokumentierte Fall in Europa stammt aus dem Frühjahr 2009, bei dem in Spanien eine Frau an einem endemisch vorkommenden porzinen Influenzavirus des Subtyps H1N1 erkrankte.

Bei der pandemisch auftretenden Influenza A/H1N1 gibt es mittlerweile Berichte aus vielen Ländern weltweit, die Übertragungen des Virus auf Schweine, Puten, Hunde, Katzen und Frettchen beschreiben. Die Erkrankungen bei den verschiedenen Tierarten zeigen, dass die pandemische Influenza A/H1N1 im Unterschied zu den endemisch bei Schweinen vorkommenden Influenzaviren wechselseitig zwischen Mensch und den genannten Tierarten übertragbar ist. Mit steigender Anzahl infizierter Tiere nimmt auch

Handelsname	Firma	Impfantigen
Ingelvac FLU	Boehringer Ingelheim	A/swine/230/92 (H1N1) A/swine/220/92 (H3N2)
Respiporc FLU	IDT Biologika	A/swine/230/92 (H1N1) A/swine/220/92 (H3N2)
Suvaxyn Flu	Fort Dodge	A/swine/Netherlands/25/80 (H1N1) A/human/Port Chalmers/1/73 (H3N2)
Viraflu	Merial	A/swine/Fort Dix/H1N1 A/human/Port Chalmers/1/73 (H3N2)
Respiroporc FLU 3	IDT Biologika	A/swine/Bakum/1769/03 (H3N2) A/swine/Haselünne/2617/03 (H1N1) A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)
Gripovac 3	Merial	A/swine/Bakum/1769/03 (H3N2) A/swine/Haselünne/2617/03 (H1N1) A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)

Tabelle 2: In Deutschland zugelassene inaktivierte Influenza-Impfstoffe beim Schwein

die Rolle der einzelnen Tierarten (insbesondere Schwein, Pute) hinsichtlich der weiteren Evolution des Virus zu, welche Konsequenzen für zukünftige immunprophylaktische Maßnahmen für die Bevölkerung haben kann. Der Eintrag der pandemischen Influenza A/H1N1 in kommerzielle Schweine- und Putenhaltungen sollte deshalb durch strikte Einhaltung der Hygiene- und Biosicherheitsmaßnahmen verhindert werden.

Der Eintrag des pandemischen Influenza A/H1N1 in Schweinebetriebe birgt als zoonotischer Erreger die Gefahr, dass die Infektion nicht nur auf das die Tiere versorgende Personal, sondern darüber hinaus aerogen auf Personen in der Umgebung übertragen werden kann. Um eine Einschätzung der Empfänglichkeit von Schweinen gegenüber der Influenza A/H1N1 und der Ausbreitung der Infektion bei Schweinen in einem betroffenen Betrieb vornehmen zu können, wurden am FLI experimentelle Infektionen mit Schweinen durchgeführt.

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

Zur Durchführung sämtlicher experimentellen Versuche wurden Hausschweine im Alter von acht bis zehn Wochen aus einer Schweinezucht in Mecklenburg-Vorpommern erworben und vor Versuchsbeginn auf die Abwesenheit von Antikörpern gegen porcine Influenzaviren der Subtypen H1N1, H3N2 und H1N2 getestet.

Zur Infektion wurden 2,0 ml des Influenzavirus A/Regensburg/D6/09/H1N1, (Institut Virologie der Philipps-Universität Marburg) mit einem Titer von 105,25 bzw. 105,375 TCID₅₀/ml intranasal verabreicht.

Die serologischen Untersuchungen erfolgten mit dem kommerziell erhältlichen ELISA zum Nachweis von Antikörpern von porcinen Influenzaviren des Subtyps H1N1 (ID-Vet) und dem „HerdChek S1-H3N2“ (IDEXX).

Die *real time* RT-PCR wurde mit Primern durchgeführt, die spezifisch das HA-kodierende Gen des Influenzavirus A/Regensburg/D6/09/H1N1 erkennen (Lange *et al.*, 2009). Die Virusisolierung erfolgte auf der MDCK-Zell-Linie (CCLV-RIE 1061) bzw. auf der Schweinehodenzell-Linie (CCLV-RIE 606). Die Immunisierung der Tiere wurde im Quarantänestall des FLI durchgeführt. Die Belastungsinfektionen erfolgten ausschließlich im Hochsicherheitsstall (L3) des FLI.

VIRUSREPLIKATION UND ÜBERTRAGUNG AUF KONTAKTTIERE

Für Untersuchungen zur Virusreplikation, Klinik sowie Übertragung der Infektion auf naive Kontakttiere wurden Infektionsexperimente mit Influenzavirus A/Regensburg/D6/09/H1N1 durchgeführt. Einen Tag nach intranasaler Infektion von fünf Schweinen wurden als Kontakttiere drei naive Schweine und fünf naive Hühner dazugestellt. Be-

ginnend drei Tage vor der Infektion wurden sämtliche Tiere täglich thermometriert, klinisch beobachtet und nasale Tupferproben genommen. Serologisch wurden alle im Versuch stehenden Tiere vor Beginn des Versuches, am siebten und vierzehnten Tag p. i. im ELISA bzw. Hämagglutinationshemmtest (HAH) untersucht. Virusnachweise in den Tupferproben wurden mittels *real time* RT-PCR und durch Virusisolierung geführt.

Bei den infizierten Schweinen verlief die Klinik generell mild. Als Symptome wurden eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens (vermehrtes Liegen) sowie erhöhte Körpertemperatur, Niesen, Nasenausfluss und Durchfall beobachtet. Ab dem dritten Tag nach Zustallung konnten die Symptome auch bei den Kontaktschweinen beobachtet werden. Die Futteraufnahme war zu keinem Zeitpunkt des Versuches beeinträchtigt. Die Nasenabstriche der infizierten Schweine waren mittels *real time* RT-PCR ab Tag 1 p. i. positiv. Die Nasenabstriche der Kontaktschweine waren ab Tag 2 nach Zustallung in der RT-PCR positiv. Im NP-ELISA und einem HA-H1 spezifischen Antikörper ELISA konnten ab Tag 7 p. i. Antikörper nachgewiesen werden. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen expandierten zwischen Tag 3 und 7 p. i. Bei den Kontakthühnern konnten keine Virusausscheidung, keine Klinik und keine Serokonversion festgestellt werden (Lange *et al.*, 2009).

SCHUTZWIRKUNG VON IMPFSTOFFEN

Zur Untersuchung der Schutzwirkung in Deutschland zugelassener und kommerziell erhältlicher Influenza-A-Impfstoffe für das Schwein gegenüber einer Belastungsinfektion mit Influenzavirus A/Regensburg/D6/09/H1N1 wurden vier Gruppen (1-4) von je fünf Tieren mit den Impfstoffen Ingelvac FLU, RespiPorc FLU, RespiPorc FLU 3 und Gripovac (siehe Tabelle 2) nach Angaben der Hersteller zweimal im Abstand von 21 Tagen intramuskulär immunisiert. Eine fünfte Gruppe mit fünf nicht immunisierten Tieren stellte die Kontrollgruppe für die Belastungsinfektion dar. Zur Untersuchung der Virusausscheidung und der möglichen Übertragung auf Kontakttiere wurden einen Tag nach Infektion der immunisierten Tiere je drei naive Schweine zu den Tieren der Gruppen 1-5 dazugestellt. Sämtliche Tiere wurden beginnend drei Tage vor der Infektion bis zum Ende des Versuches täglich thermometriert, klinisch beobachtet sowie nasale und rektale Tupferproben genommen. Serologisch wurden alle im Versuch stehenden Tiere vor Beginn des Versuches, am 21. und 42. Tag des Versuches im ELISA bzw. HAH untersucht. Virusnachweise in den Tupferproben wurden mittels *real time* RT-PCR und durch Virusisolierung geführt.

Alle vakzinieren Schweine reagierten nach der Impfung mit positiven Antikörpertitern im ELISA und HAH. Während die Antikörpertiterbestimmung im H1N1-ELISA schon nach 21 Tagen bei allen geimpften Tieren positiv war, reagierten im

Vakzine	Tag nach Immun.	H1N1 [A/swine/Germany/Belzig/2/01]					H3N2 [A/swine/Germany/Bakum/909/93]					H1N2 [A/swine/Germany/Bakum/1832/00]				
		Tier					Tier					Tier				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Ingelvac FLU	0	- (-)	- (-)	20 (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	-	-	-	-	20
	21	1280 (++)	640 (+)	n.d.	1280 (++)	640 (++)	- (-)	- (-)	n.d.	80 (+)	40 (-)	20	-	n.d.	40	20
	42	320 (++)	1280 (-)	2560 (++)	160 (++)	640 (++)	2560 (++)	1280 (-)	1280 n.t.	1280 (++)	2560 (+)	20	-	20	-	-
Respiporc FLU	0	- (-)	- (-)	20 (+)	- (-)	- (-)	- (-)	20 (-)	- (-)	- (-)	- (-)	-	-	-	-	20
	21	2560 (+)	1280 (++)	1280 (++)	640 (+)	2560 (+)	40 (-)	80 (-)	20 (-)	40 (-)	40 (-)					
	42	320 (++)	320 (+)	2560 (+)	640 (++)	640 (++)	640 (+)	1280 (-)	320 (-)	640 (+)	1280 (++)					
Respiporc FLU 3	0	- (-)	20 (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	-	-	-	-	-
	21	640 (+)	320 (+)	- (+)	640 (+)	320 (+)	20 (-)	20 (-)	- (-)	80 (-)	40 (-)	320	160	-	80	320
	42	80 (+)	80 (-)	- (-)	160 (+)	320 (+)	80 (-)	160 (-)	160 (-)	640 (-)	640 (+)	160	640	640	320	640
Gripovac	0	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	-	-	-	-	-
	21	640 (+)	160 (+)	1280 (+)	160 (+)	1280 (+)	40 (-)	80 (-)	20 (-)	40 (-)	40 (-)	-	20	40	-	40
	35	320 (+)	640 (++)	2560 (+)	640 (++)	2560 (+)	160 (-)	80 (-)	320 (+)	320 (-)	320 (+)	-	40	-	40	-

Tabelle 3: Antikörperentwicklung nach Immunisierung im HAH und ELISA

H3N2 ELISA rund die Hälfte der Impflinge erst 42 Tage nach der Impfung positiv. Im HAH gegen die entsprechenden Subtypen reagierten ebenfalls alle geimpften Tiere 21 Tage nach der Impfung gegen H1N1 und H1N2 positiv, während gegen H3N2 erst nach 42 Tagen bei allen Tiere positive Titer nachweisbar waren. Die serologischen Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Alle immunisierten Schweine waren vor und nach der Vakzinierung ohne besonderen klinischen Befund. Sie entwickelten nach der Immunisierung kein Fieber, die Futtaufnahme blieb unverändert.

Nach intranasaler Belastungsinfektion mit $10^{5,25}$ TCID₅₀ Influenzavirus A/Regensburg/D6/09/H1N1 zeigten alle Tiere der Gruppe 5 klinische Symptome (erhöhte Temperatur, beeinträchtigt Allgemeinzustand, Niesen, Husten). Alle vakzinieren Tiere in den Gruppen 1-4 zeigten ebenfalls einen Anstieg der Rektaltemperatur um 1 bis 1,5°C. Mit Ausnahme der Tiere in Gruppe 1 waren in den anderen Gruppen zusätzlich klinische Symptome wie beeinträchtigt Allgemeinzustand (vermehrtes Liegen), aber auch Niesen zu beobachten.

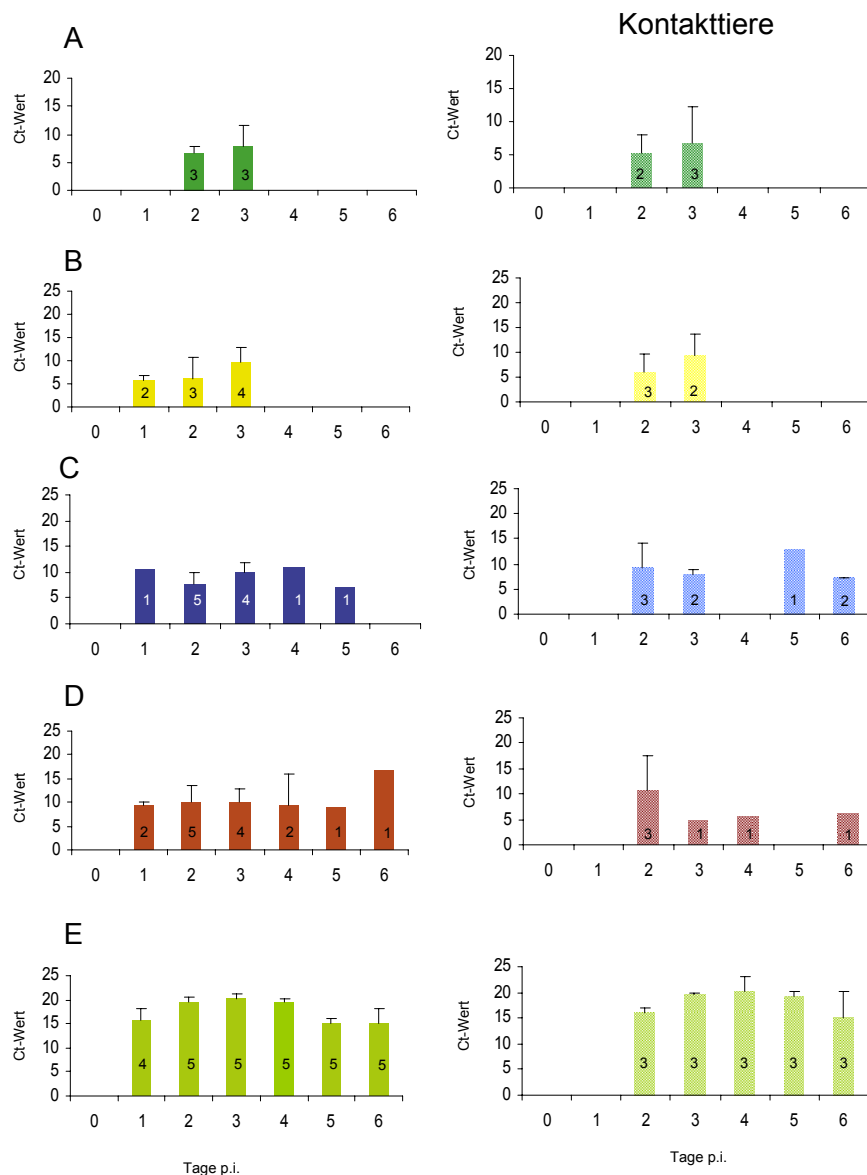
Die an Tag 1 p. i. dazugestellten naiven Kontaktschweine zeigten ebenfalls einen Anstieg der Rektaltemperatur um 1 bis 1,5°C. Des Weiteren entwickelten die Kontakttiere aller Gruppen ebenfalls milde klinische Symptome, wie erhöhte Körpertemperatur, beeinträchtigt Allgemeinzustand (vermehrtes Liegen) und Niesen.

Der Virusnachweis mittels RT-PCR in den täglich entnommenen Nasen- bzw. Rektaltupfern war sowohl bei den immunisierten als auch bei den zugestellten Kontaktschweinen spätestens am zweiten Tag p. i. bzw. am ersten Tag

nach Zustellung in allen Gruppen positiv. In Gruppe 1 und 2 konnte RNA bis zum dritten Tag p. i. bei allen vakzinieren Tieren entweder im Nasentupfer oder im Rektaltupfer nachgewiesen werden. Die zugestellten Kontaktschweine in diesen beiden Gruppen waren am ersten und zweiten Tag nach Zustellung ebenfalls in beiden Tupfern positiv. Danach konnte in den Tupferproben keine RNA mehr nachgewiesen werden.

In der Gruppe 3 und 4 konnten in den Nasentupfern der Schweine bis zum fünften Tag p. i. in der *real time* RT-PCR positive ct-Werte (35) ermittelt werden. Bei den naiven Kontakttieren der Gruppen 3 und 4 waren bis zum fünften Tag nach Zustellung einzelne Tiere positiv. In der Gruppe 5 waren nach Infektion alle Schweine vereinzelt einen Tag p. i. im Nasen- bzw. Rektaltupfer positiv. Bis zum sechsten Tag p. i. (Sektionstag) waren alle Tiere im Nasentupfer deutlich positiv. In den Rektaltupfern wurden vereinzelt positive Befunde bis zum sechsten Tag p. i. gemessen. Die drei Kontaktschweine dieser Gruppe waren ab dem zweiten Tag nach Zustellung sowohl im Nasen- als auch im Rektaltupfer positiv. Die Ergebnisse der *real time* RT-PCR der Nasentupfer sind in den Abbildung 1 dargestellt.

Serologische Untersuchungen mit Seren von Schweinen, die mit eurasischen Influenzaviren des Subtyps H1N1 infiziert bzw. immunisiert waren, zeigten, dass Antikörper dieser Seren mit dem pandemischen A/H1N1/2009 kreuzreagierten (Dürwald et al., 2010; Kyriakis et al., 2010). Dies war auf Basis der relativ geringen Sequenzhomologien nicht zu erwarten.

**Abb. 1:**

Real-time RT-PCR Ergebnisse der mit Ingelvac FLU (A), Respiorc FLU (B), Respiorc FLU 3 (C) und Gripovac (D) immunisierten Schweine. Die nicht-immunisierte naive Kontrollgruppe für die Belastungsinfektion ist in (E) dargestellt. Je fünf Tiere wurden immunisiert und drei naive Kontakttiere an Tag 1 p. i. zu den individuell gehaltenen Gruppen dazugestellt. Dargestellt sind die durchschnittlichen ct-Werte der positiven Tiere nach der Formel 40 minus ct-Wert. Die Anzahl der positiven Tiere ist in die Balken eingefügt.

Unsere experimentellen Untersuchungen zeigten, dass Schweine als sehr empfänglich für das pandemische Influenzavirus A/H1N1/2009 anzusehen sind (Lange *et al.*, 2009, Brookes *et al.*, 2009). Nach unseren ersten Untersuchungen mit immunisierten Tieren ist davon auszugehen, dass eine Impfung mit kommerziellen Impfstoffen gegen endemische Influenzaviren beim Schwein sowohl die Ausscheidungsdauer des Virus als auch die Ausscheidungsmenge nach Infektion mit dem pandemischen Influenzavirus A/H1N1/09 deutlich vermindert, jedoch die Übertragung der Infektion mit dem pandemischen Virus auf naive Kontakttiere nicht verhindert.

MASSNAHMEN BEI EINTRAG DER INFLUENZAVIRUS A/H1N1/2009 INFEKTION IN SCHWEINEBETRIEBE

Auch wenn einzelne Berichte nur bedingt Schlussfolgerungen über mögliche Eintragsursachen zulassen und z. T. die Art des Untersuchungsmaterials und die durchgeführten Untersuchungen nicht näher beschrieben sind, muss mit weiteren Einträgen des A/H1N1/2009 Virus in kommerzielle Schweinebestände gerechnet werden. Solange der Kontakt mit infizierten Personen als einzig gesicherte Infektionsquelle von Schweinen angesehen wird, muss auf eine strikte Einhaltung der Biosicherheit in den Betrieben

geachtet werden und der Zugang zu Beständen nur für gesundes Personal erlaubt und auf dieses beschränkt bleiben. Zum Umgang mit infizierten Schweinen hat die EU nach Konsultation aller Mitgliedsstaaten einen Leitfaden verfasst („Working document on surveillance, monitoring and control measures for the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in pigs“ [SANCO/6211/2009 vom 03.11.2009]). Für infizierte Betriebe sollte ein grundsätzliches Verbringungsverbot verfügt werden. Es wird davon ausgegangen, dass sieben Tage nach Abklingen der klinischen Symptome die Virusausscheidung vernachlässigbar ist und die Tiere anschließend wieder gehandelt werden dürfen. Weitere Maßnahmen für einen individuellen Fall werden von den Mitgliedsstaaten separat festgelegt. Die in den betroffenen Beständen durchgeführten Maßnahmen sollten im Wesentlichen bestehen in:

- Bestandssperre
- Epidemiologische Untersuchung
- Erregerisolierung und Bestimmung
- Erhöhung von Biosicherheitsmaßnahmen
- Aufhebung der Beschränkungen für betroffene Bestände sieben Tage nach Beendigung der klinischen Symptomatik.

LITERATUR

- BROOKES, S.M., R.M. IRVINE, A. NUNEZ, D. CLIFFORD, S. ESSEN, I.H. BROWN, K. VAN REETH, G. KUNTZ-SIMON, W. LOEFFEN, E. FONI, I. LARSEN, M. MATROSOVICH, M. BUBLLOT, J. MALDONADO, M. BEER, AND G. CATTOLI. 2009. Influenza A (H1N1) infection in pigs. *Vet Rec* 164:760-1.
- CHOI Y.K., S.M. GOYAL, AND H.S. JOO. 2002. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. *Arch Virol* 147:1209-1220
- COHEN, J. 2009. Swine flu outbreak: new details on virus's promiscuous past. *Science* 324:1127.
- DÖHNER, L. 1987. Morphologie, Struktur und Biologie der Influenzaviren. SÜSS, J. *Influenza*. VEB Fischer, Jena, S. 19-50.
- DÜRRWALD, R. *et al.* 2010. Epidemiologische Untersuchungen zur Schweineinfluenza in Deutschland. *Vet-MedReport* 33 (V10):17.
- EASTERDAY, B.C., W.S. HINSHAW, AND D. HALVORSON. 1997. Influenza. In: Calnek BW. (Ed.), *Disease of Poultry*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, S. 583-606.
- GARTEN, R.J., C.T. DAVIS, C.A. RUSSELL, B. SHU, S. LINDSTROM, A. BALISH, W.M. SESSIONS, X. XU, E. SKEPNER *et al.* 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325:197-201.
- KYRIAKIS, C.S., C.W. OLSEN, S. CARMAN, I.H. BROWN, S.M. BROOKES, J. VAN DOORSSELAERE, AND K. VAN REETH. 2010. Serologic Cross-Reactivity with Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Pigs, Europe. *Emerg Infect Dis* 16:96-99.
- LANGE, E., D. KALTHOFF, U. BLOHM, J.P. TEIFKE, A. BREITHAUP, C. MARESCH, E. STARICK, S. FEREIDOUNI, B. HOFFMANN, T.C. METTENLEITER, M. BEER, AND T.W. VAHLENKAMP. 2009. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J Gen Virol* 90:2119-23.
- SHOPE, R.E. 1931. Swine influenza: filtration experiments and etiology. *J Exp Med* 54, 373-385.
- SMITH, G.J., D. VIJAYKRISHNA, J. BAHL, S.J. LYCETT, M. WOROBEY, O.G. PYBUS, S.K. MA, C.L. CHEUNG, AND J. RAGHWANI. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459:1122-1125.

Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger (INNT)

HEPATITIS E IN DEUTSCHLAND: NEUE HERAUSFORDERUNGEN AN DIE VETERINÄRMEDIZINISCHE FORSCHUNG?

Eiden, M., Dremsek, P., Vina Rodriguez, A., Groschup, M.H., Ulrich, R.G.

Seit Einführung des Gesetzes zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz, IfSG) im Jahr 2001 sind in Deutschland jährlich rund 20 bis 100 Hepatitis E-Fälle gemeldet worden. Im Jahr 2006 wurde über den ersten autochthonen Fall in Deutschland berichtet. In anschließenden Studien wurde bei 68 Prozent der zwischen Mai 2006 und August 2007 gemeldeten Hepatitis E-Fälle eine Infektionsquelle außerhalb Deutschlands ausgeschlossen. Untersuchungen in Wildschweinen aus verschiedenen Bundesländern Deutschlands zeigten ein bereits längeres Vorkommen des Hepatitis E-Virus (HEV) und eine breite geographische Verbreitung des Virus mit zum Teil sehr hohen Prävalenzen. Eine erste Studie in Hausschweinbeständen hat ebenfalls ein deutschlandweites Vorkommen von HEV-spezifischen Antikörpern belegt. Im vorliegenden Beitrag soll eine kurze Zusammenfassung zum gegenwärtigen Stand der Kenntnisse zur Struktur, Genomorganisation, Übertragung, Verbreitung und Diagnostik von HEV und den Aktivitäten des Instituts für neue und neuartige Tierseuchenerreger (INNT) und seiner Kooperationspartner auf dem Gebiet der HEV-Diagnostikentwicklung und Zoonoseforschung gegeben werden.

TAXONOMIE, STRUKTUR UND GENOMORGANISATION

Hepatitis E wurde erstmals als eine von der Hepatitis A verschiedene Erkrankung wahrgenommen, als neuentwickelte spezifische Testverfahren für den Nachweis von Hepatitis A-Virus (HAV) bei der Untersuchung der epidemischen, durch Trinkwasser übertragenen Hepatitis in Indien eingesetzt wurden. Die erfolgreiche experimentelle Übertragung des Erregers auf nicht-humane Primaten führte später dann zur Klonierung, Sequenzierung und Charakterisierung des Genoms. Nachdem das Virus ursprünglich der Familie *Caliciviridae* zugeordnet worden war, führte die weitere Charakterisierung zu einer Eingruppierung des Genus *Hepevirus* in die vorgeschlagene neue Familie *Hepeviridae*. Das kürzlich beschriebene aviäre HEV bei Hühnern unterscheidet sich genetisch stark von den Säugetier-HEV, weshalb vorgeschlagen wurde, es einem neuen separaten Genus zuzuordnen. Die gegenwärtig akzeptierte Klassifikation der Säugetier-assoziierten HEV sieht, basierend auf phylogenetischen Untersuchungen, eine Unterteilung in vier Genotypen vor (siehe Abb. 1).

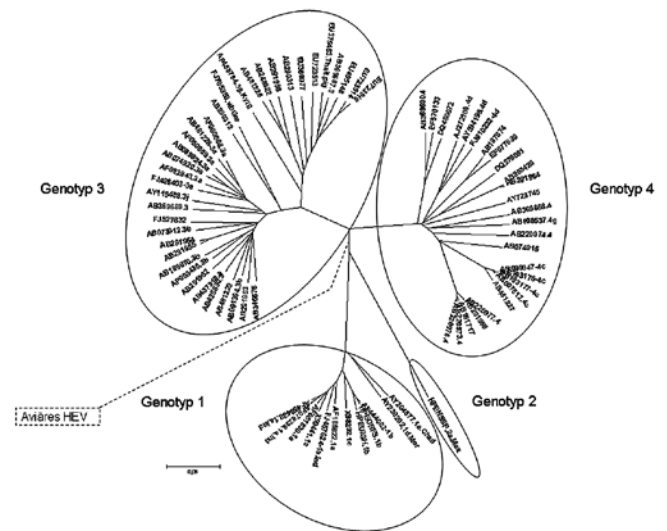


Abb. 1:

Phylogenetischer Baum von 123 aviären, porzinen und humanen Stämmen der Familie Hepeviridae auf der Basis des vollständigen Genoms. Die Genotypen 1 und 2 sind auf den Menschen beschränkt, die Genotypen 3 und 4 sind Zoonoseerreger, die auch in Reserviertieren (Haus- und Wildschwein, Hirsch) gefunden werden. Das aviäre HEV kommt nur beim Geflügel vor und wird wegen seiner starken genetischen Unterschiede zu den anderen Genotypen als eine eigenständige Gattung angesehen.

Beim HEV handelt es sich um unbehüllte sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 30 bis 34 Nanometern mit einer indefiniten Oberflächensubstruktur. Das ikosaedrische Kapsid wird von einem einzigen Kapsidprotein (pORF2) gebildet. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass ein zweites virales Protein (pORF3) ebenfalls an der Oberfläche von freigesetzten Partikeln lokalisiert ist.

Das Genom von HEV ist eine nicht segmentierte, einzelsträngige lineare RNA positiver Polarität von ca. 7,2 Kilobasen (kb) Länge. Es enthält am 5'-Ende eine kurze, nicht translatierte Region (5'-NTR) mit einer Cap-Struktur und eine kurze 3'-NTR, die von einem 150 bis 200 Resten langen polyA-Schwanz abgeschlossen wird. Der ORF2, der den ORF3 überlappt, aber in einem anderen Leseraster liegt, kodiert das Kapsidprotein, während der ORF3 die kodierende Information für ein kleines Zytoskelett assoziiertes Phosphoprotein enthält. Im ORF1 wurden mittels Analogieuntersuchungen verschiedene funktionelle Domänen identifiziert (Emerson und Purcell, 2007; Meng, 2009; siehe Abb. 2A).

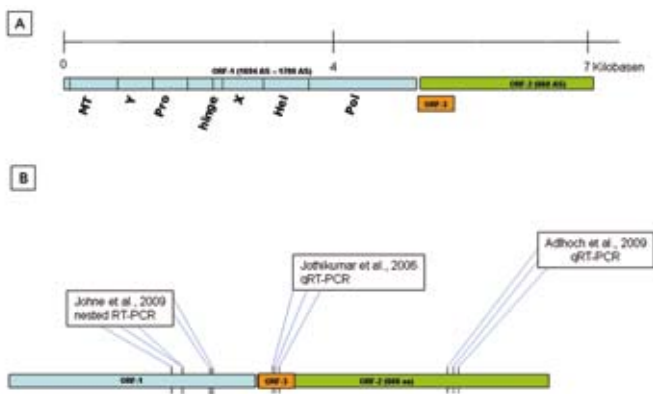


Abb. 2: Genomorganisation des Hepatitis E-Virus (A) und Targetregionen ausgewählter publizierter RT-PCR-Assays (B). MT, Methyltransferase/Guanylyltransferase; Pol, RNA-abhängige RNA-Polymerase; Pro, Protease; Hel, Helikase; hinge, Prolin-reiche Region.

KLINIK DER HEPATITIS E

Die Hepatitis E verläuft beim Menschen in der Regel als milde bis moderate Erkrankung und ist in der klinischen Symptomatik nicht von anderen virusbedingten Hepatitiden zu unterscheiden. Nach einer Inkubationsperiode von 15 bis 60 Tagen (Durchschnitt 40 Tage) treten grippeähnliche Symptome, Erbrechen, Fieber, Gelenk- und Kopfschmerzen auf, die mit einem Anstieg der Leberenzymwerte einhergehen. Obwohl das HEV normalerweise eine selbstlimitierte akute Hepatitis mit anschließender Rekonvaleszenz verursacht, sind jedoch in jüngster Zeit einige Fälle von chronischen Verläufen der Hepatitis E nach Organtransplantationen beschrieben worden. Symptomatische HEV-Infektionen werden am häufigsten bei Jugendlichen und Erwachsenen im Alter von 15 bis 40 Jahren beobachtet. Obwohl HEV-Infektionen bei Kindern häufig sind, verlaufen sie meist asymptomatisch. Nur in seltenen Fällen verlaufen HEV-Infektionen letal. Während jedoch die Letalität durchschnittlich bei 0,5 bis 4 Prozent liegt, treten vor allem in Entwicklungsländern bei Schwangeren aus bisher unbekanntem Grund häufig fulminante Verläufe auf, die in dieser Gruppe zu einer Letalität von 15 bis 25 Prozent führen. Eine weitere Risikogruppe sind Patienten mit chronischen und alkoholtoxischen Lebererkrankungen, bei denen es zu einer fulminanten Hepatitis kommen kann.

Beim Schwein verlaufen natürliche HEV-Infektionen normalerweise symptomlos. Auch bei Infektionsexperimenten konnte mit Ausnahme subklinischer Läsionen keine Klinik nachgewiesen werden. Infizierte Schweine können jedoch das Virus ausscheiden und Kontakttiere infizieren. Auch bei experimentellen HEV-Infektionen von Ratten und Mäusen ließen sich keine oder nur geringfügige sporadische histologische Befunde feststellen (Meng, 2009).

EPIDEMIOLOGIE DER HEPATITIS E

Die vier Säugetier-HEV-Genotypen unterscheiden sich in ihrem Übertragungsweg und in ihrer geographischen Verbreitung (Abb. 3). In Indien und Burma sind die ersten Vertreter des HEV identifiziert worden, die wie weitere Stämme aus asiatischen Endemiegebieten dem Genotyp 1 zugeordnet werden. Sequenzen des Genotyps 2 wurden erstmals bei einem Ausbruch in Mexiko nachgewiesen. Genotyp 3 wurde erstmals in den USA beschrieben, tritt jedoch weltweit auf und ist auch in allen Industrieländern Europas verbreitet. Genotyp 4 wurde bei sporadischen Fällen mit akuter Hepatitis in China, Vietnam, Taiwan und Japan gefunden.

Das HEV ist verantwortlich für große Ausbrüche von akuter Hepatitis in Entwicklungsländern, insbesondere in tropischen und subtropischen Regionen der Welt. Die durch fäkal verunreinigtes Trinkwasser ausgelösten Ausbrüche in den Hauptendemiegebieten können bis zu mehrere tausend Personen betreffen. Die meisten Hepatitis E-Fälle in Europa und den USA lassen sich auf Reisen in Endemiegebiete zurückführen. Zunehmend wird allerdings auch über autochthone Fälle ohne Reiseanamnese berichtet, die nahelegen, dass das Virus auch in diesen Ländern, darunter auch in Deutschland, endemisch vorkommt (siehe Okamoto, 2007; Meng, 2009).

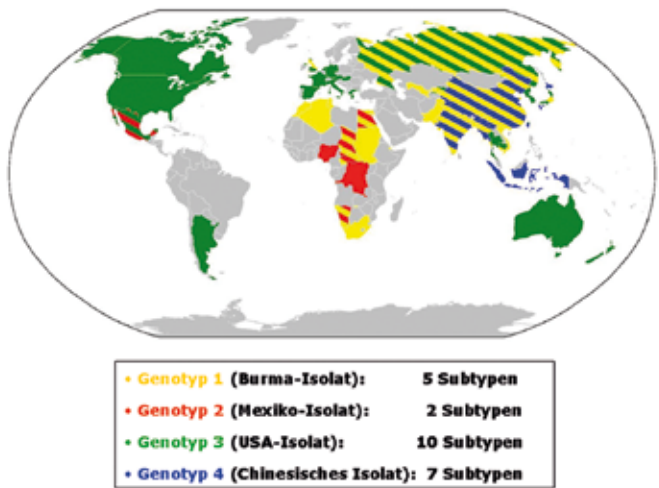


Abb. 3: Weltkarte mit Hepatitis E-Endemiegebieten und geographisches Vorkommen der Genotypen 1, 2, 3 und 4 (nach Okamoto, 2007).

HEPATITIS E-VIRUS – EIN ZOONOSEERREGER

Die Übertragung des HEV erfolgt hauptsächlich fäkal-oral. Meist sind die Hepatitis E-Epidemien in asiatischen und afrikanischen Entwicklungsländern und in Mexiko mit HEV-kontaminiertem Trinkwasser assoziiert. Bei sporadischen Hepatitis E-Fällen in Entwicklungsländern und Industrie-

staaten wurden kontaminierte und unzureichend erhitzte Lebensmittel und Tierfleisch sowie direkter Kontakt zu infizierten Tieren als Risikofaktoren mit den Erkrankungen assoziiert. Die vertikale Übertragung oder eine parenterale Übertragung sind seltenere Übertragungswege. Der Nachweis von HEV-Infektionen infolge von Bluttransfusionen hat zur Diskussion der Notwendigkeit der HEV-Testung von Spenderblut geführt.

Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass die HEV-Genotypen 1 und 2 ausschließlich beim Menschen zu finden sind. Für die Genotypen 3 und 4 haben sich in den vergangenen Jahren Hinweise verdichtet, dass es sich dabei um einen von Hirsch, Haus- und Wildschwein übertragenen Zoonoseerreger handelt. Die Sequenzähnlichkeiten von HEV aus Schweinen, Wildschweinen, Hirschen und bei Patienten aus der gleichen geographischen Region, epidemiologische Zusammenhänge zwischen dem Konsum von rohem oder ungenügend gegartem Fleisch von Wildschwein, Hirsch oder Hausschwein (besonders Schweineleber) und humanen HEV-Infektionen und die erfolgreiche experimentelle Übertragung von humanen HEV-Isolaten der Genotypen 3 und 4 auf das Schwein belegten diese Vermutung. In Übereinstimmung damit wurde auch bei Personen, die in engem Kontakt zu Schweinen stehen, wie Schweinezüchter, Schlachthofmitarbeiter und Tierärzte, eine im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich höhere Seroprävalenz gefunden. Neben den Genotypen 1-4 sind in den vergangenen Jahren noch weitere HEV-verwandte Viren entdeckt worden, darunter das aviäre HEV, das jedoch nicht als zoonotischer Erreger gilt. Der Erstnachweis von HEV-ähnlichen RNA-Sequenzen bei Wanderratten bestätigt frühere Untersuchungen, die bei Wanderratten, anderen Rattenarten und Nagetieren HEV-reaktive Antikörper, teilweise mit sehr hohen Prävalenzen, nachgewiesen hatten (Meng, 2009; Johne *et al.*, 2009).

Diagnostik von HEV-Infektionen

MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK VON HEV-INFESTIONEN

Neben nested RT-PCR-Methoden werden gegenwärtig auch verschiedene quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) Assays zum Nachweis viraler RNA verwendet, wobei die Targetregionen im ORF-3 bzw. im ORF-2 liegen (Abb. 2B). Für einen hochempfindlichen Virusnachweis mittels RT-PCR ist auch die Auswahl entsprechender Untersuchungsmaterialien von Bedeutung. Bei Wildschweinen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Verwendung von Gewebeproben, vor allem Leber und Galle, besser für den HEV-Genomnachweis geeignet ist als die Nutzung von Serumproben (Adlhoch *et al.*, 2009).

Im Rahmen europaweiter Screenings konnten unter Verwendung dieser qRT-PCR-Assays Haus- und Wildschweinpopu-

lationen als natürliches HEV-Reservoir identifiziert werden. So wurde HEV in Beständen aus Großbritannien, Frankreich, Ungarn, Italien, den Niederlanden, Spanien, Schweden und Deutschland (siehe Punkt 6.) detektiert.

Auch für den Nachweis HEV-verwandter Viren wurden entsprechende neue molekulare Nachweismethoden entwickelt. So wurden für den Nachweis des aviären HEV und eines neuen HEV-Stammes in Zuchtkaninchen neue nested RT-PCR entwickelt. Für den Erstnachweis eines HEV-ähnlichen Virus bei Wanderratten wurde eine neuartige Pan-nested RT-PCR im Bereich des ORF-1 eingesetzt, die möglicherweise auch für den zukünftigen Nachweis weiterer HEV-ähnlicher Viren in anderen Spezies geeignet sein könnte (Abb. 2B).

SEROLOGISCHE DIAGNOSTIK

Die zurzeit wichtigste Basis der Diagnose beim Patienten stellt der Nachweis von anti-HEV-IgM- und anti-HEV-IgG-Antikörpern im Blut dar. Die HEV-spezifischen Antikörper sind gegen die stark immunogenen Strukturproteine, das Kapsidprotein (pORF2) und das Phosphoprotein (pORF3), gerichtet, wobei man pORF2-Proteinderivaten eine höhere Sensitivität für die IgM- und IgG-Antikörper-Detektion zuschreibt. Die Bildung von VLPs durch Baculovirus-vermittelte Expression von amino- und carboxy-terminal verkürztem pORF-2 ermöglichte ebenfalls die Etablierung entsprechender ELISA-Verfahren.

Kommerzielle Tests zum serologischen Nachweis von HEV-Infektionen bei Mensch und Tier (ELISA, Immunoblot) sind verfügbar und basieren auf den rekombinant hergestellten viralen Proteinen pORF2 und pORF3. In der Regel werden dazu Proteine des Genotyps 1 eingesetzt; neuere Tests verwenden stattdessen oder zusätzlich aber auch Proteine des Genotyps 3. Die Wahl des Genotyps bei der Antigenherstellung scheint jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der Tests zu haben, da alle HEV-Genotypen einem einzigen Serotyp zugeordnet werden (Meng, 2009).

Ein großes Problem für die Virusdiagnostik und die Erforschung der Mechanismen der HEV-Replikation ist das bisherige Fehlen von standardisierten Zellkultursystemen für die effiziente Anzucht des HEV.

HEPATITIS E IN DEUTSCHLAND

Mit Einführung des Infektionsschutzgesetzes im Jahr 2001 wurde die Hepatitis E in Deutschland eine meldepflichtige Erkrankung. Bisher sind insgesamt 522 Hepatitis E-Fälle gemeldet worden, wobei die Zahl der jährlich gemeldeten Fälle zwischen 17 und 106 schwankt (RKI SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 29. Januar 2010; siehe Tabelle 1). Während im Jahr 2005 44 Prozent der gemeldeten Fälle nicht mit Auslandsaufenthalten in Verbindung zu bringen

waren, stieg dieser Anteil in den Jahren 2006/2007 auf über 60 Prozent.

Die Ursachen für diese Veränderungen sind nicht bekannt. Inzwischen haben erste Untersuchungen in Deutschland auch das Vorkommen von HEV in Reservoirwirten gezeigt. So konnte bei einer retrospektiv durchgeführten Untersuchung an Wildschweinsereien aus Mecklenburg-Vorpommern aus den Jahren 1995/96 in insgesamt 10 von 189 (5,3 Prozent) untersuchten Tieren das HEV-Genom nachgewiesen werden (Kaci *et al.*, 2008; Abb. 4). Bei einer weiteren Studie an Leberproben von Wildschweinen aus Berlin, Brandenburg und Thüringen betrug die Virusprävalenz 14,9 Prozent (Schielke *et al.*, 2009; Abb. 4). In Wildschweinproben, die in Rheinland-Pfalz, Brandenburg, Sachsen und Baden-Württemberg gesammelt wurden, konnte mittels qRT-PCR in Abhängigkeit von der untersuchten Probe (Serum, Galle, Leber) eine durchschnittliche Virusprävalenz von 68,2 Prozent - 100 Prozent festgestellt werden (Adlhoch *et al.*, 2009). Die Sequenzierung im Bereich des ORF-2 und eine anschließende phylogenetische Untersuchung der HEV-Stämme ergaben das Vorliegen verschiedener Subtypen des Genotyps 3, die sich unterschiedlichen geographischen Regionen zuordnen lassen. Eine erste seroepidemiologische Untersuchung an Hausschweinen aus elf Bundesländern zeigte eine weite geographische Verbreitung HEV-reaktiver Antikörper an. Die Prävalenz innerhalb der Länder schwankte dabei zwischen 30 Prozent und 100 Prozent (Baechlein *et al.*, 2010).

Die dargestellten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Hepatitis E in Deutschland endemisch als Zoonose vorkommt und das Virus wahrscheinlich bei einem erheblichen Teil der autochthonen Erkrankungsfälle durch den Verzehr von ungenügend gegartem Fleisch übertragen wurde (Robert Koch-Institut, 2008).

PROPHYLAXE UND THERAPIE

Eine antivirale Therapie gegen das HEV ist bisher nicht verfügbar. Dagegen gibt es inzwischen vielversprechende Impfstoffentwicklungen, die eine zukünftige Zulassung von Impfstoffen für humane Anwendungen erwarten lassen. Wegen der fehlenden Impfstoffe und antiviralen Therapieansätze kommt deshalb der Expositionsprophylaxe gegenwärtig große Bedeutung zu. Obwohl das HEV ein unbehülltes und nach Darmpassage infektiöses Virus ist, kann es durch Erhitzen vollständig inaktiviert werden. So wurde beispielsweise bei ausreichendem Kochen von HEV-kontaminierter Schweineleber eine vollständige Inaktivierung erreicht (Meng, 2009).

Neben dem vollständigen Garen von Fleisch und insbesondere von Leber potentieller Reservoirwirte, d. h. von Hausschweinen, Rot- und Schwarzwild, sollte in Endemiegebieten der Genotypen 1 und 2 auf die Trinkwasserqualität und hohe hygienische Standards geachtet werden, um eine fäkal-orale Übertragung des Erregers zu vermeiden. Die Ein-

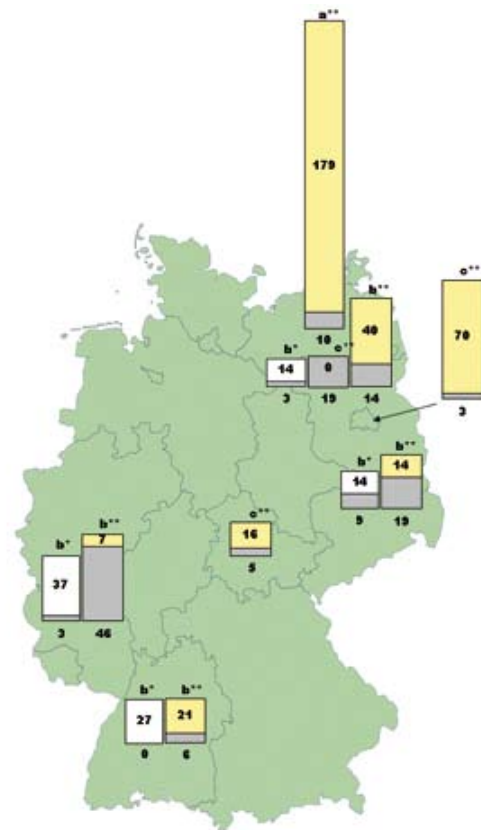


Abb. 4:

Darstellung der bisher erhobenen serologischen (*) und RT-PCR-Befunde (**) zu HEV-Infektionen bei Wildschweinen (entnommen aus a, Kaci *et al.*, 2008; b, Adlhoch *et al.*, 2009; c, Schielke *et al.*, 2009). Der Anteil positiver Proben ist in den Säulen grau unterlegt, der Anteil negativer Proben ist weiß (Serologie) oder gelb (RT-PCR) unterlegt.

haltung hygienischer Standards betrifft insbesondere Personengruppen, die beruflich vermehrt Kontakt mit Hausschweinen, Rot- oder Schwarzwild haben.

FORSCHUNGSAKTIVITÄTEN AM INNT

Die Aktivitäten des INNT konzentrieren sich gegenwärtig auf die Etablierung hochsensitiver und hochspezifischer serologischer und molekularbiologischer Nachweisverfahren für HEV. Die Entwicklung einer neuen, sensitiven qRT-PCR soll den Virus-Nachweis auch in schwach positiven (Feld-) Proben ermöglichen. Mithilfe verschiedener qRT-PCR wurden inzwischen bereits über tausend Proben von Wild- und Hausschwein auf das Vorliegen auf HEV-Genomsequenzen untersucht. Dabei wurden HEV-Prävalenzen gefunden, die den in der Literatur berichteten entsprachen. Es wurde zudem eine RT-PCR entwickelt, die in Verbindung mit der Sequenzierung der spezifischen Amplifikate die phylogenetische Einordnung der HEV-Stämme in die unterschiedlichen (Sub-)Genotypen erlaubt.

Zur Etablierung serologischer Nachweisverfahren wurde in Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) das komplette Kapsidprotein und verkürzte Derivate eines Wildschwein-assoziierten HEV des Subgenotyps 3i aus Deutschland in *Escherichia coli* exprimiert. Auf der Basis dieser rekombinanten Proteine sollen entsprechende serologische Verfahren für den Nachweis HEV-spezifischer Antikörper in Haus- und Wildschweinen entwickelt werden. Unter Verwendung kommerzieller Tests und verbesserter neuentwickelter Antikörpernachweisverfahren werden ferner epidemiologische Studien in Deutschland durchgeführt, um die Durchseuchung von Wildschweinen und von Hauschweinbeständen und deren Schwankungen genauer zu charakterisieren.

Von diesen molekularbiologischen und serologischen Studien werden auch neue Erkenntnisse zu den zugrunde liegenden Übertragungsmechanismen und zur Aufklärung von Infektketten erwartet. Die Aufklärung dieser Übertragungswege stellt eine wichtige Voraussetzung für eine zukünftige Verbesserung des Schutzes der Verbraucher vor der Lebensmittel-vermittelten Übertragung des HEV dar. Die Untersuchungen dienen somit auch zur Entwicklung von Handlungsempfehlungen für eine zukünftige nachhaltige Tierhaltung und das Wildtiermanagement.

Hierzu gehören auch Untersuchungen an Proben von Wanderratten, die im Rahmen des am INNT angesiedelten Netzwerkes „Nagetier-übertragene Pathogene“ gesammelt werden. Diese Untersuchungen dienen zunächst der Aufklärung der vollständigen Nukleinsäuresequenz des Ratten-HEV, der Charakterisierung seiner antigenen Eigenschaften und der Entwicklung serologischer und molekularbiologischer Nachweisverfahren. Diese Verfahren bilden die Grundlage für zukünftige Infektionsexperimente, weitere epidemiologische Untersuchungen zur Übertragung und Verbreitung des Virus und zur Charakterisierung der Bedeutung dieses Virus als Zoonoseerreger für den Menschen oder Haus- und Nutztiere.

Die durch das Auftreten autochthoner HEV-Fälle in Deutschland entstandenen neuen Herausforderungen lassen sich nur durch eine enge Zusammenarbeit der zuständigen Ressortforschungseinrichtungen Robert Koch-Institut, Bundesinstitut für Risikobewertung und Friedrich-Loeffler-Institut, des zuständigen Konsiliarlaboratoriums, von veterinär- und humanmedizinischen Untersuchungs- und Forschungseinrichtungen sowie von Wildtierforschungseinrichtungen bewältigen.

LITERATUR

- ADLHOCH, C., A. WOLF, H. MEISEL, M. KAISER, H. ELLERBROK, AND G. PAULI. 2009. High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet Microbiol* 139:270-8.
- BAECHLEIN, C., A. SCHIELKE, R. JOHNE, R.G. ULRICH, W. BAUMGAERTNER, AND B. GRUMMER. 2009. Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbiol* (im Druck).
- EMERSON S.U., AND R.H. PURCELL. 2007. HEPATITIS E VIRUS. IN: KNIPE DM UND HOWLEY PM (Hrsg.). *Fields Virology*. 5. Ausgabe. Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins, S. 3047-58.
- JOHNE, R., A. PLENGE-BÖNIG, M. HESS, R.G. ULRICH, J. REETZ, AND A. SCHIELKE. 2009. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* (im Druck).
- JOTHIKUMAR, N., T.L. CROMEANS, B.H. ROBERTSON, X.J. MENG, AND V.R. HILL. 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131:65-71.
- KACI, S., K. NÖCKLER, AND R. JOHNE. 2008. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet Microbiol* 128:380-5.
- MENG, X.J. 2009. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 140:256-65.
- OKAMOTO, H. 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127:216-28.
- ROBERT KOCH-INSTITUT. 2008. *Epidemiologisches Bulletin* 49, 5.12.2008.
- SCHIELKE, A., K. SACHS, M. LIERZ, B. APPEL, A. JANSEN, AND R. JOHNE. 2009. Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virol J* 14:58.

INSTITUT FÜR TIERERNÄHRUNG (ITE)

B-VITAMINE IN DER MILCHVIEHERNÄHRUNG

Hüther, L., Lebzien, P., Bigalke, W.

Wesentliche Bedeutung für Gesundheit und Leistung der Milchkuh sowie für die Qualität von Milch und Fleisch hat unter anderem eine ausreichende Versorgung der Tiere mit Vitaminen. Während die fettlöslichen Vitamine mit dem Futter zugeführt werden müssen, können die wasserlöslichen Vitamine der B-Gruppe (Thiamin (B1), Riboflavin (B2), Pyridoxin (B6), Cobalamin (B12), Biotin, Folsäure, Niacin, (Pantothensäure) im intakten Pansen durch Mikroorganismen gebildet werden. Im Allgemeinen gilt die Versorgung mit B-Vitaminen aufgrund dieser mikrobiellen Eigensynthese bei wiederkäuergerecht ernährten Rindern als ausreichend, weshalb sie in älteren Versorgungsempfehlungen auch keine Berücksichtigung fanden.

Die in den vergangenen Jahren erheblich gestiegenen Milchleistungen, der damit verbundene höhere Nährstoff- und Energieumsatz, veränderte Fütterungsbedingungen (Trend zu kraftfutterreicherer Fütterung) sowie höhere Vitaminausscheidungen mit der Milch haben jedoch zunehmend Zweifel an dieser Annahme aufkommen lassen und Fragen nach einer leistungsgerechteren Versorgung von Wiederkäuern mit B-Vitaminen aufgeworfen. Bei den in Deutschland und Amerika im Jahr 2001 vorgenommenen Bedarfsableitungen durch die Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE) bzw. das National Research Council (NRC) wurde offensichtlich, dass die Datenlage zur mikrobiellen B-Vitamin-Synthese im Pansen nur unzureichend ist. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass in Abhängigkeit von der Rationsgestaltung in unterschiedlichem Umfang die im Futter enthaltenen bzw. zugesetzten Vitamine im Pansen abgebaut werden. Die wenigen vorliegenden Dosis-Wirkungsstudien zur Versorgung von Milchkuhen mit B-Vitaminen deuten darauf hin, dass es unter bestimmten Bedingungen zu einer suboptimalen Versorgung der Tiere kommen kann, wenn diese allein über die natürlich vorkommenden Gehalte im Futter und die ruminale Synthese erfolgt. Die Datenlage ist jedoch inkonsistent und ermöglicht nur in sehr begrenztem Umfang Aussagen darüber, wie sich B-Vitaminzulagen in Abhängigkeit von der Rationsgestaltung auf den Stoffwechsel der Milchkuh auswirken und welche Mengen oder Anteile an zugesetzten Vitaminen das Duodenum erreichen, wie viel ins Blut aufgenommen und über die Milch ausgeschieden wird.

Auf dieser Grundlage wurde ab dem Jahr 2006 am Institut für Tierernährung des FLI damit begonnen, Umsetzungen von B-Vitaminen durch Pansenmikroorganismen und die Anflutung von B-Vitaminen am Duodenum an ruminal und

duodenal fistulierten Milchkuhen unter Berücksichtigung unterschiedlich zusammengesetzter Rationen und B-Vitaminzulagen systematisch zu untersuchen. Der Schwerpunkt dieser Arbeiten lag auf den verdauungsphysiologischen Zusammenhängen zwischen mikrobiellen Umsetzungen im Pansen und duodenaler Anflutung von B-Vitaminen. Darüber hinaus wurden der Vitaminstatus im Blut und die Höhe der jeweiligen Vitamin-Ausscheidung mit der Milch ermittelt.

Während in der Vergangenheit bereits Untersuchungen an fistulierten und intakten Milchkuhen zum Einfluss verschiedener Futtermengen auf die Thiaminnettosynthese in den Vormägen sowie den Biotin- und Cobalaminfluss am Duodenum von Wiederkäuern durchgeführt worden sind, wurden in den neueren Arbeiten die Vitamine Niacin, Folsäure und Pantothensäure betrachtet. Hierzu galt es zunächst eine adäquate Analytik am Institut zu etablieren.

B-VITAMINANALYTIK

Die klassische Bestimmung von B-Vitaminen erfolgt mit Methoden, die jedes Vitamin nur einzeln erfassen können. Darunter fallen sowohl mikrobiologische Assays als auch nasschemische Methoden, bei denen das Vitamin in flüchtigere oder farbige Reaktionsprodukte umgesetzt wird. Eine zeitsparende Analyse durch simultane Bestimmung mehrerer B-Vitamine und die Differenzierung in die verschiedenen so genannten Vitamere ist mit beiden Verfahren nicht möglich. Da es derzeit keine Analysenmethode gibt, mit der sich B-Vitamine gemeinsam bestimmen lassen, es jedoch von Interesse ist, auch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Vitaminen sowie den Vitaminstatus insgesamt zu erfassen, wurde parallel zu den Fütterungsversuchen damit begonnen, zunächst für Blutserum eine Analysenmethode mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zu entwickeln, mit der die B-Vitamine zeit- und kostensparend in einem Analysengang bestimmt werden können.

Durch ihre sehr verschiedenen Strukturen weist die Gruppe der B-Vitamine viele physikalische und chemische Unterschiede auf (Abb. 1), die hohe Anforderungen an die HPLC-Trennmethode sowie auch an die Probenaufbereitung stellen. Die Quantifizierung der B-Vitamine in biologischen Proben wird zudem durch sehr geringe Konzentrationen, durch das Vorkommen verschiedener Vitamere und weiterer Bindungsformen erschwert. Die Probenaufbereitung

zur HPLC-Analytik muss daher zusätzlich zur notwendigen Proteinfällung und Extraktion lipophiler Bestandteile auch gebundene Vitamine freisetzen und die jeweilige Form als Standard bei der Trennung und der Kalibrierung berücksichtigen. Bei der entwickelten Methode findet zehnpromtente Trichloressigsäure als Fällungsmittel Verwendung, die anschließende Extraktion der Säure mit Diethylether hebt den pH-Wert der Probe wieder an und verhindert somit, dass Verluste an säureempfindlichen Vitaminen auftreten. Eine weitere Herausforderung in der Methodenentwicklung ist die hohe Oxidationsempfindlichkeit der B-Vitamine. Eine Probenstabilisierung mit antioxidativen Zusätzen wie Ascorbinsäure und Komplexbildnern (phosphorsaure Titriplex-V-Lösung), die Reduktion des Probevolumens unter Stickstoff (Inertgas), Lichtausschluss und die Verwendung eines kühlbaren Autosamplers sind weitere notwendige Maßnahmen, die zur Vermeidung von B-Vitaminverlusten bei der quantitativen Analyse getroffen wurden. Abbildung 2 zeigt das Schema der entwickelten Probenaufbereitungsmethode zur simultanen Bestimmung von B-Vitaminen im Blutserum von Milchkühen.

Die Detektion der Vitamine erfolgt über einen Diodenarraydetektor (DAD; UV/Vis-Detektor), gekoppelt mit einem Fluoreszenzdetektor (FLD). Für die Überprüfung der Selektivität der Methode und der Peakreinheit über 3D-Chromatogramme im Rahmen der Methodenentwicklung ist ein DAD unerlässlich, da ansonsten die Gefahr besteht, co-eluierende Substanzen der Matrix fälschlicherweise mit zu quantifizieren. Die Analyse der fluoreszierenden B-Vitamine in einem Analysenlauf ermöglicht ein sensitiver Fluoreszenzdetektor durch retentionszeitabhängige Variation der Anregungs- und Emissionswellenlängen für Pyridoxal-5-phosphat, Pyridoxinsäure, Pyridoxal, Pyridoxin, Pyridoxamin, FAD, Riboflavin, Tetrahydrofolat und 5-Methyl-Tetrahydrofolat. Abbildung 3 zeigt die Chromatogramme der verschiedenen B-Vitamine und Vitamere einer aufbereiteten Blutserumprobe, die von den verschiedenen Detektoren in einem einzigen Analysenlauf mit Hilfe der entwickelten HPLC-Methode aufgenommen wurden.

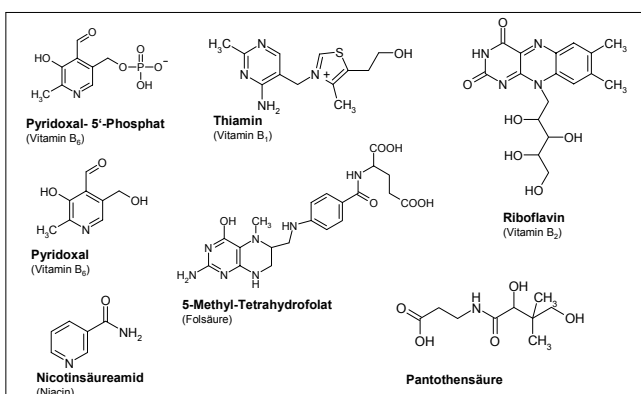


Abb. 1: Strukturformeln ausgewählter B-Vitamine

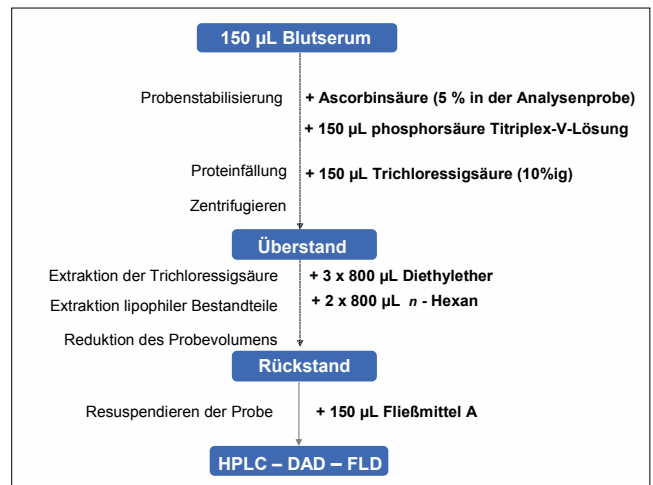


Abb. 2: Schema der entwickelten Probenaufbereitungsmethode zur simultanen Bestimmung verschiedener B-Vitamine in Blutserum.

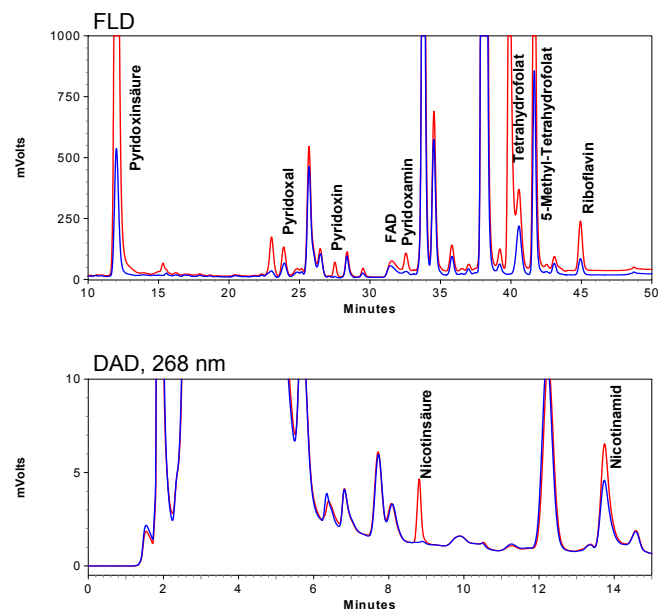


Abb. 3: Ausgewählte Chromatogramm-Ausschnitte einer nach Abb. 2 aufbereiteten Blutserumprobe; DAD: Diodenarray-, FLD: Fluoreszenzdetektor; blau: undotierte Probe, rot: mit einer Multi-B-Vitaminstandardlösung dotierte Probe.

NIACIN

Niacin (Nicotinsäure, Nicotinamid) hat als Coenzym von Nicotinadenindinukleotid (NAD) und Nicotinadenindinukleotidphosphat (NADP) eine große Bedeutung für den Energiestoffwechsel im Tier. Die Milchkuh erhält Niacin neben der Zufuhr über das Futter und durch die mikrobielle Synthese im Pansen zusätzlich durch die Umwandlung von Tryptophan und Quinalinsäure. Allerdings ist die Synthese-



rate im Pansen umgekehrt proportional zu der mit dem Futter verabreichten Niacinmenge, wobei Schätzungen zu Folge lediglich 1,5 bis 30 Prozent des zugesetzten Niacins den Dünndarm erreichen. Es gibt Hinweise darauf, dass ebenso wie bei anderen B-Vitaminen auch die ruminale Synthese von Niacin von der verfütterten Ration beeinflusst wird. Allerdings gibt es auch hier bisher nur wenige Studien, in denen der duodenale Niacinfluss beim Einsatz verschiedener Rationen verglichen wurde. Zudem führten diese zu zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen. Bei Hochleistungstieren wird häufig von positiven Wirkungen zusätzlicher Niacin-gaben sowohl auf die mikrobiellen Umsetzungen im Pansen als auch auf den Intermediärstoffwechsel und damit auf die Milchleistung berichtet. Andererseits existiert auch eine Reihe von Untersuchungen, in denen positive Wirkungen zusätzlicher Niacingaben ausblieben (Niehoff *et al.*, 2009). Daher wurde am ITE der Effekt einer Niacinzulage bei Rationen mit unterschiedlichen Grundfutter:Kraftfutter (GF: KF)-Verhältnissen auf verschiedene Parameter des Pansen- und Intermediärstoffwechsels, den Niacinfluss am Duodenum sowie die Niacinkonzentrationen in Blut und Milch untersucht. Hierzu wurden drei trockenstehende und sieben laktierende Holstein-Friesian Kühe im mittleren Laktationsabschnitt eingesetzt. Die Kühe waren doppelt fistuliert, mit je einer Fistel im dorsalen Pansensack und im proximalen Duodenum. Die verwendeten Rationen bestanden entweder aus 1/3 Kraftfutter und 2/3 Grundfutter, 1/2 Kraftfutter und 1/2 Grundfutter oder 2/3 Kraftfutter und 1/3 Grundfutter auf Trockensubstanzbasis. Jede Ration wurde in einem Versuchsdurchgang ohne und in dem Folgenden mit Zulage von sechs Gramm Nicotinsäure pro Tier und Tag verfüttert. Die Niacinzulage zeigte einige Effekte auf den Pansenstoffwechsel. Obwohl weniger Futterrohprotein im Pansen abgebaut wurde, stieg sowohl die Ammoniakkonzentration als auch die mikrobielle Proteinsynthese im Pansen bei den mit Niacin supplementierten Tieren, was auf eine effizientere Nutzung des abgebauten Futterrohproteins für die mikro-

bielle Proteinsynthese durch die Niacinzulage hinweist. Der Anteil der organischen Substanz, der in den Vormägen fermentiert wurde, blieb durch die Zulage unverändert. Die Mengen an Niacin am Duodenum stiegen sowohl bei Niacinsupplementierung als auch mit zunehmendem Kraftfutteranteil in der Ration (Tab. 1). Zwischen der mikrobiellen Proteinsynthese und dem Niacinfluss am Duodenum konnte ein enger Zusammenhang beobachtet werden (Abb. 4), der darauf hindeutet, dass mit erhöhtem Mikrowachstum auch die Niacinsynthese im Pansen ansteigt und/oder sich der Abbau vermindert.

Weitere Effekte zeigten sich im Intermediärstoffwechsel. Entsprechend den höheren Ammoniakkonzentrationen im Pansen nach der Niacinsupplementierung zeigte sich auch im Blut eine höhere Harnstoffkonzentration. Die ebenfalls erhöhten Glucosekonzentrationen im Serum sind aufgrund vieler möglicher Einflussfaktoren nicht eindeutig zu erklären. Im Gegensatz zu dem aufgrund von Literaturergebnissen erwarteten Abfall der Konzentrationen an freien Fettsäuren und β -Hydroxybutyrat im Serum durch eine Niacinzulage blieben diese im vorliegenden Versuch unbeeinflusst. Eine Erklärung hierfür könnte das Laktationsstadium der Tiere sein oder die Tatsache, dass lediglich die nicht im Blutserum vorhandene Nicotinsäure, nicht aber das Nicotinamid antilipolytisch wirkt. Die Gehalte an Nicotinamid im Serum stiegen sowohl durch die Niacinzulage als auch mit höheren Kraftfutteranteilen in der Ration. Allerdings konnte trotz höherer Serum-Nicotinamid-Konzentrationen in den Zulage-Gruppen kein Einfluss auf den Nicotinamidgehalt der Milch beobachtet werden. Dieser wurde jedoch durch das GF:KF Verhältnis beeinflusst (Tab.1). Die Niacinzulage zeigte keinen signifikanten Effekt auf verschiedene Kennzahlen der Milchleistung, was aber aufgrund der für einen Milchleistungsversuch geringen Tierzahl und des relativ kurzen Versuchszeitraums nicht überzubewerten ist.

	1/3 KF		1/2 KF		2/3 KF		ANOVA, p-Werte		
	Kontrolle	+ Niacin	Kontrolle	+ Niacin	Kontrolle	+ Niacin	Anteil KF	Niacin	Anteil KF x Niacin
Niacin-Aufnahme (mg/d)	553	6449	325	6337	476	6370			
Niacin am Duodenum (mg/d)	1602	2021	1886	2221	1895	2630	<0,001	<0,001	0,25
NAM im Blut (mg/L)	0,32	0,36	0,35	0,46	0,41	0,52	<0,001	<0,001	0,11
NAM in der Milch (mg/L)	0,54	0,55	0,66	0,72	0,61	0,64	0,02	0,26	0,80

Tabelle 1: Niacinaufnahme und -flüsse am Darm sowie Nicotinamid (NAM)-Konzentrationen in Blut und Milch.

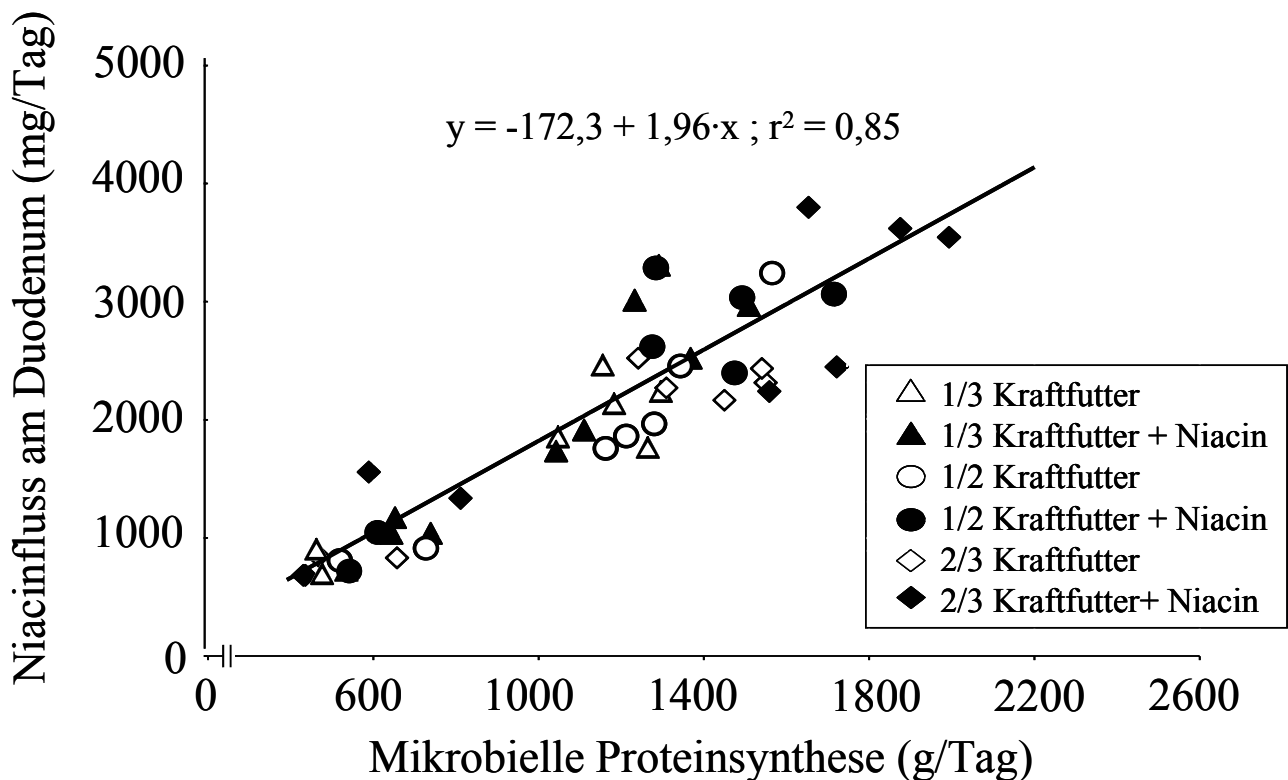


Abb. 4:
Beziehung zwischen mikrobieller Proteinsynthese und Niacinfluss am Duodenum.

Aus der vorliegenden Untersuchung kann gefolgert werden, dass die Verfütterung von sechs Gramm Nicotinsäure pro Kuh und Tag Einflüsse auf den Stoffwechsel, insbesondere den Pansenstoffwechsel der Kuh hat, wobei die Wirkung der Zulage scheinbar nicht von der Rationsgestaltung beeinflusst wird, da keine signifikanten Interaktionen zwischen den beiden Versuchsfaktoren auftraten. Allerdings hatte die Rationsgestaltung per se einen Einfluss auf den Fluss von Niacin am Duodenum sowie auf dessen Konzentration in Blut und Milch. Vergleicht man die ermittelten Niacinflüsse am Darm mit den Bedarfsschätzungen des NRC von 2001 für Gewebe und Milch, so scheint der Bedarf der Kuh unabhängig von der Rationsgestaltung oder Niacinzulagen gedeckt zu sein.

FOLSÄURE UND PANTOTHENSÄURE

Während Folsäure wichtige biochemische Coenzym-Funktionen vor allem als Akzeptor und Überträger von Hydroxymethyl-, Methyl- und Formylgruppen besitzt, spielt Pantothersäure als Bestandteil von Coenzym A und vom Acyl-Carrier-Protein im Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsel eine wichtige Rolle. Ausgehend von den ersten Bedarfsangaben des NRC (2001) scheinen Folsäure und

Pantothersäure die einzigen B-Vitamine zu sein, bei denen die ruminale Synthese den geschätzten Bedarf nicht decken kann. Aus diesem Grund wurden die beiden Vitamine für weitere Studien am ITE ausgewählt.

Das verwendete Versuchsdesign entsprach weitgehend dem der Untersuchungen mit Niacin mit dem Unterschied, dass lediglich zwei Rationen eingesetzt wurden, die sich im Grundfutter:Kraftfutter-Verhältnis unterschieden: 1/3 KF und 2/3 GF bzw. 2/3 KF und 1/3 GF auf Trockensubstanzbasis. In den jeweiligen Versuchsgruppen wurden 1 g Folsäure bzw. 1 g Pantothersäure pro Tier und Tag supplementiert. Die Folsäurezulage reduzierte lediglich beim Einsatz der kraftfutterreichen Ration die Menge an ruminal fermentierter organischer Substanz geringfügig. Obwohl dieser Effekt nicht signifikant war, stand dadurch den Mikroorganismen im Pansen weniger Energie zur Verfügung, was zu einem verringerten mikrobiellen Proteinfluss am Duodenum führte. Die Folsäurezulage zur kraftfutterreichen Ration führte zudem zu einer geringeren Glucose- und Riboflavin-Konzentration im Serum. Die Supplementierung zur grundfutterreichen Ration hatte hingegen keinen Einfluss auf die Konzentrationen von Glucose, freien Fettsäuren, β -Hydroxybutyrat und Harnstoff sowie auf die Gehalte an Thiamin, Riboflavin, Pyridoxal-5'-Phosphat, Pyridoxinsäure, Pyrido-

xal, Pyridoxamin, Pantothersäure und Nicotinamid im Blutserum. Unabhängig vom GF:KF-Verhältnis konnte kein Einfluss der Folsäure-Zulage auf die Milchzusammensetzung (Fett, Protein, Laktose) nachgewiesen werden. Allerdings steigerte die Folsäuregabe den duodenalen Folatfluss, die 5-Methyl-Tetrahydrofolat-Konzentration im Serum sowie die Folatkonzentration und -menge in der Milch.

Der Pantothersäurezusatz reduzierte während der Fütterung der kraftfutterreichen Ration die Gesamtkonzentration an kurzkettigen Fettsäuren im Pansen sowie die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese. Beim Einsatz der grundfutterreichen Ration verringerte die Pantothersäuregabe den molaren Anteil der Propionsäure sowie den duodenalen Stärkefluss, während die Menge an ruminal fermentierter organischer Substanz stieg. Ein Einfluss auf Blutparameter konnte nur bei der kraftfutterreichen Ration beobachtet werden. Hier reduzierte die Pantothersäure sowohl die Glucose- als auch die Riboflavin-Konzentration. Unabhängig von der Rationsgestaltung war der Einfluss von Pantothersäure auf die Milchvariablen vernachlässigbar.

Lediglich bei der grundfutterreichen Ration steigerte die Pantothersäure-Zulage den duodenalen Pantothersäurefluss. Es konnte kein Effekt einer Supplementierung auf die Pantothersäurekonzentrationen in Serum und Milch sowie auf die mit der Milch täglich ausgeschiedenen Pantothersäuremengen beobachtet werden. Abgesehen vom gesteigerten Duodenalfluss an Pantothersäure während der grundfutterreichen Fütterung zeigte sich, dass die Pantothersäuremengen und -konzentrationen während der Fütterung der kraftfutterreichen Ration vergleichsweise höher waren als während der grundfutterreichen Fütterung.

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann insgesamt geschlossen werden, dass beide Vitamine einen eher geringen Einfluss auf die ruminale Fermentation sowie den Metabolismus der Milchkuh haben. Basierend auf den duodenalen Flüssen von Folsäure und Pantothersäure konnte lediglich die Folsäure-Supplementierung den vom NRC (2001) vorgeschlagenen Bedarf decken, jedoch waren anhand der Ergebnisse dieser Studie keine Vorteile für die Kuh ersichtlich.

SCHLUSSBEMERKUNG

Die dargestellten Versuche können bisher nur einen ersten Schritt zur Untersuchung des Metabolismus und der Effekte von B-Vitaminen darstellen. Weitere Versuche müssen Aufschlüsse über eventuelle Wechselwirkungen zwischen Zulagen einzelner B-Vitamine geben. Dringend erforderlich sind zudem exakt abgeleitete Bedarfswerte für die verschiedenen Vitamine für unterschiedliche Leistungsrichtungen, Leistungsstadien, Stoffwechselsituationen und Umweltbedingungen.

LITERATUR

- NIEHOFF, I.-D., L. HÜTHER, AND P. LEBZIEN. 2009. Niacin for dairy cattle: a review. *Br J Nutr* 101:5-19.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. ed., Nat. Academy Press, Washington, DC



Institut für Tierschutz und Tierhaltung (ITT)

ANSPRÜCHE VON LEGEHENNEN AN IHRE HALTUNG HINSICHTLICH DES RUHE- UND STAUBBADEVERHALTENS

Scholz, B., Pickel, T., Schrader, L.

Die Ausstattung von Haltungseinrichtungen für Legehennen stellt nach wie vor eine Herausforderung hinsichtlich der Anforderungen an ein möglichst tiergerechtes Haltungssystem dar. Durch die Umsetzung der EU Richtlinie 1999/74/EG zu „Mindestanforderungen für die Haltung von Legehennen“ in nationales Recht (Zweite VO zur Änderung der Tierschutznutztierhaltungsverordnung, 2006) hat der Gesetzgeber wesentliche Verhaltensansprüche für die Haltung von Legehennen aufgegriffen und festgelegt, welche Möglichkeiten zur Ausübung artgemäßer Verhaltensweisen in den jeweiligen Haltungsformen bestehen müssen. Die in Deutschland zugelassene Kleingruppenhaltung für Legehennen, welche die konventionelle Käfighaltung ab Januar 2009 ersetzt, stellt ein Haltungssystem für 28 bis 60 Hennen pro Abteil dar und weist eine Mindestgrundfläche von 2,5 m² bei einem Platzangebot von mind. 800 cm²/Henne auf. Zusätzlich ist die Kleingruppenhaltung mit einem Lege-nest (90 cm²/Henne), einem Einstreubereich (90 cm²/Henne) sowie mit Sitzstangen ausgestattet. Um insbesondere den Verhaltensanforderungen von Legehennen an ein ungestörtes Ruheverhalten zu entsprechen, hat der Gesetzgeber festgelegt, dass in jedem Kleingruppenabteil „mindestens zwei Sitzstangen vorhanden sein müssen, die in unterschiedlicher Höhe angeordnet sind“. Für die Bodenhaltung, bei der Hennen in Großgruppen bis zu 6.000 Tieren/Abteil entweder in ein- oder auch in mehretagigen Systemen (Voliersysteme) gehalten werden, ist das Angebot von Sitzstangen ebenfalls gesetzlich gefordert, um ein „ungestörtes, gleichzeitiges Ruhen aller Hennen zu ermöglichen“. In Volierenhaltungen sind die Sitzstangen konstruktionsbedingt aufgrund der unterschiedlichen Ebenen eines Systems erhöht installiert. Es ist bekannt, dass Hennen zum nächtlichen Ruhen möglichst hoch angebrachte Sitzstangen bevorzugen. Grund ist, dass die Hennen durch das Aufsuchen erhöhter Schlafplätze Schutz vor Raubfeinden suchen. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob Hennen der Höhe eines Schlafplatzes eine größere Bedeutung beimessen als der Möglichkeit, tatsächlich auf einer Sitzstange zu ruhen, unabhängig von deren Höhe. Diese Fragestellung ist insbesondere hinsichtlich der Positionierung von Sitzstangen in Haltungssystemen wichtig. Um diese Frage zu klären, wurde die Bedeutung der Höhe von Sitzstangen experimentell untersucht (Schrader und Müller, 2009).

WIE WICHTIG IST LEGEHENNEN DIE HÖHE EINER SITZSTANGE?

In drei Durchgängen wurden insgesamt 36 Gruppen mit jeweils neun Legehennen in experimentellen Bodenhaltungsabteilen (1,6 x 3,8 m) gehalten. Die eine Hälfte der Gruppen hatte die Herkunft Lohmann Brown, die andere Hälfte Lohmann Selected Leghorn. Den Hennen wurden in jedem Abteil jeweils zwei Podeste in verschiedenen Kombinationen zum Ruhen angeboten. Die Podeste unterschieden sich in der Höhe (15 cm (L) und 60 cm (H)) und in ihrem Boden (Gitter (G) oder Sitzstangen (P)) und boten den Hennen ausreichend Platz zur freien Wahl (30 cm Sitzstange, 650 cm² Gitterfläche je Henne). Anhand der Kombinationen, bei denen Gitter und Sitzstangen jeweils gleichzeitig auf einer Höhe angeboten wurden (HP/HG oder LP/LG), wurde getestet, ob die Hennen Sitzstangen oder Gitter zum nächtlichen Ruhen bevorzugen. Ob sie hohe oder niedrige Ruheorte bevorzugen, wurde getestet, indem ihnen jeweils zwei Podeste mit dem gleichen Boden, aber unterschiedlicher Höhe (LP/HP oder LG/HG) angeboten wurden. Die kritische Kombination war das gleichzeitige Angebot eines erhöhten Podestes mit Gitter und einem niedrigen Podest mit Sitzstangen (LP/HG). Als Kontrolle wurde den Hennen die Kombination niedriges Gitter und erhöhte Sitzstangen angeboten (LG/HP). Die Hennen wurden jeweils in der 20. Lebenswoche in die experimentellen Abteile eingestallt und in den Lebenswochen 20, 22, 24, 26, 28, und 30 wurden Videoaufzeichnungen durchgeführt, aus denen über zwei aufeinander folgende Nächte ermittelt wurde, wie viele Hennen jeweils auf welchem der beiden Podeste ruhten. Da sich die Präferenz der Hennen für eine der beiden jeweils angebotenen Podeste zwischen den Lebenswochen 28 und 30 nicht mehr veränderte, wurden die Präferenzen in Lebenswoche 30 einer detaillierten, statistischen Analyse unterzogen. Es zeigte sich, dass die Hennen beider genetischer Herkünfte – wie erwartet – die erhöhten gegenüber den niedrigen Podesten und die Podeste mit Sitzstangen gegenüber denen mit Gitter zum nächtlichen Ruhen bevorzugten. Konnten sie zwischen einem erhöhten Podest mit Sitzstangen und einem niedrigen Podest mit Gitter wählen, bevorzugten sie erwartungsgemäß das erhöhte Podest mit Sitzstangen. Interessant war, dass die Hennen das erhöhte Podest mit Gitter zum nächtlichen Ruhen bevorzugten, wenn ihnen diese gleichzeitig mit niedrigen Podesten mit Sitzstangen angeboten wurden (Abb. 1). Hieraus lässt sich ableiten, dass den

Hennen die Höhe des nächtlichen Ruheortes wichtiger war als das Vorhandensein einer Sitzstange. Sitzstangen in Haltungssystemen sollten den Hennen daher möglichst erhöht angeboten werden.

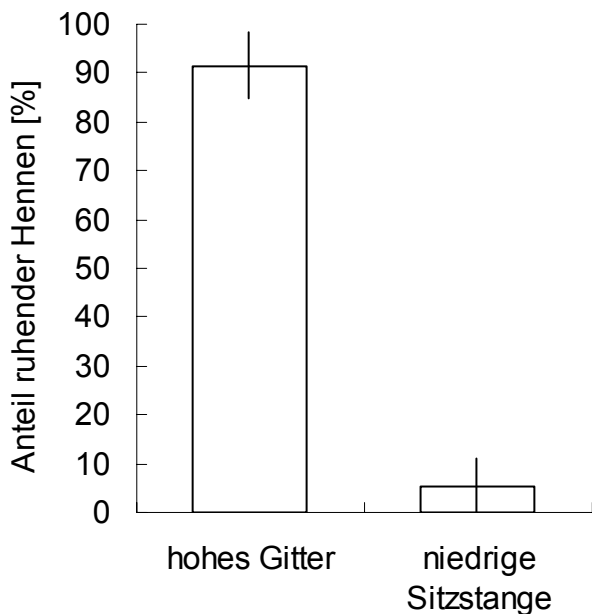


Abb. 1: Anteil ruhender Hennen auf erhöhten Podesten mit Gitterboden und niedrigen Podesten mit Sitzstangen.

ENTWICKLUNG EINER ERGONOMISCHEN SITZSTANGE FÜR LEGEHENNEN

Verschiedene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der Einsatz von Sitzstangen in Haltungseinrichtungen den Hennen zwar ein Aufbaumen und das Aufsuchen eines erhöhten Ruheplatzes ermöglicht, er sich aber auch negativ auf das Brustbein der Tiere auswirken kann. Insbesondere in Volierenhaltungen, aber auch in Kleingruppenhaltungen sind bei einer großen Anzahl an Hennen Brustbeindeformationen und -frakturen festgestellt worden, die sich vermutlich in erster Linie auf eine Kollision mit Sitzstangen (Frakturen) bzw. auf eine starke Druckbelastung während der Sitzstangennutzung zurück führen lassen (Scholz et al., 2008, Scholz et al., 2009). Auch hinsichtlich der Fußballengesundheit gibt es Untersuchungen, die auf eine negative Auswirkung von Sitzstangen auf die Fußballengesundheit schließen lassen (Rönchen et al., 2008). Durch ein ungünstiges Sitzstangendesign in Verbindung mit einem feuchten Mikroklima auf der Sitzstangenoberfläche und einer starken, punktuellen Druckbelastung auf die Sohlenballen kann es zu starken Verhornungen (Hyperkeratosen), Läsionen und einer Keimbeseidlung der Sohlen- und Zehenballen kommen, was bis zum Auftreten von Sohlenballengeschwüren führen kann.

Wie sollten Sitzstangen demzufolge geformt sein, um auch hinsichtlich der Tiergesundheit (Vermeidung von Brustbeinfrakturen und Fußballenproblemen) den Anforderungen an die Tiergerechtigkeit zu entsprechen? Um dieser Frage nachzugehen, wird gegenwärtig in einem gemeinsamen Projekt mit der Firma SteriOne (Berlin) eine „ergonomische“ Sitzstange für Legehennen entwickelt, welche den negativen Eigenschaften herkömmlicher Sitzstangen (meist harte, inflexible Materialien, oft geringe Rutschsicherheit, ungenügender Hygienegrad der Sitzstangenoberfläche) entgegenwirken und sich den anatomischen Begebenheiten der Hennen anpassen soll. Gleichzeitig soll die Oberfläche dieser Sitzstange mit einem antimikrobiell wirksamen Additiv versehen werden.

In einem ersten Schritt wurden die Verhaltensweisen von Legehennen auf Sitzstangen mit verschiedenen Materialkombinationen und Durchmessern videogestützt untersucht. Über zwei Durchgänge hinweg wurden in jeweils fünf Bodenhaltungsabteilen, die mit wechselnden Sitzstangentypen ausgestattet waren, insgesamt 60 LSL Hennen eingestellt (5 Hennen/Abteil). Über einen Zeitraum von jeweils neun Wochen wurden Videoaufzeichnungen zur Sitzstangennutzung durchgeführt, wobei u. a. Balancebewegungen, das Ruhe- und Schlafverhalten sowie das Bewegungsverhalten der Hennen erfasst wurden. Dabei wurden neben Holz- und Stahlstangen auch gummierte Stangen der Firma SteriOne eingesetzt, die mit einer flexiblen, Schmutz abweisenden und zugleich auch antimikrobiellen Oberfläche ausgestattet waren. Die Untersuchungen zeigten, dass Hennen auf den gummierten Sitzstangen signifikant weniger Balancebewegungen ausführten im Vergleich zu Tieren auf den Holz- und Stahlstangen, was auf eine bessere Rutschfestigkeit hindeutet. Mit steigendem Durchmesser der Sitzstange nahmen die Balancebewegungen darüber hinaus weiter ab. Interessanterweise ruhten Hennen auf den verwendeten Stahlstangen vermehrt mit dem Kopf im Gefieder im Vergleich zu Tieren auf den anderen Sitzstangen. Dies könnte aufgrund der höheren Wärmeleitfähigkeit der Stahlstangen möglicherweise thermoregulatorisch bedingt sein und demzufolge nicht alleinig für die Qualität des Ruhens sprechen. Eine makroskopische Untersuchung zur Oberflächenverschmutzung zeigte darüber hinaus, dass die verwendeten gummierten Sitzstangen im Vergleich zu den Holz- und Stahlstangen eine geringere Verschmutzung aufwiesen, was sich günstig auf den Hygienegrad der Sitzstange und somit auf die Fußballengesundheit der Hennen auswirken könnte. In einem weiteren Schritt wurden bei Hennen zweier verschiedener Herkünfte mittels eines Druckmesssystems der Firma CMV Hoven (Mönchengladbach) Messungen zur Druckbelastung von Brustbein, Fuß- und Zehenballen während der Sitzstangennutzung durchgeführt, um Anhaltspunkte für die Druckverteilung zu gewinnen, da insbesondere eine zu hohe punktuellen Druckbelastung sowohl für Brustbeindeformationen als auch für Schädigungen der

Fußballen verantwortlich gemacht wird. Für diese Untersuchung wurden ebenfalls Sitzstangen mit unterschiedlichen Formen und Durchmessern sowie variierenden Härtegraden verwendet. Mit Hilfe einer Versuchsapparatur, die nacheinander mit insgesamt 20 unterschiedlichen Sitzstangenmodellen, auf die jeweils zwei Sensorfolien zur Druckmessung aufgebracht wurden, ausgestattet wurde, wurden Messungen an jeweils 36 Hennen (LSL, LB) durchgeführt. Die Hennen wurden dazu einzeln in der Dunkelphase auf die Sitzstange in die Versuchsapparatur verbracht (Abb. 2). Im Anschluss wurden Messungen sowohl mit auf der Stange stehenden als auch mit auf der Stange sitzenden Tieren durchgeführt (pro Henne max. 15 min Messdauer).



Abb. 2: Henne in der Versuchsapparatur zur Messung der Druckverteilung zwischen Brustbein und Fußballen während der Sitzstangennutzung.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Druckmaxima während der Sitzstangennutzung interessanterweise zu etwa 80 % unterhalb des schmalen Brustbeines auftraten und nur zu ca. 20 % unterhalb der Fußballen (Pickel, 2009). Anhand der Druckmessungen wurde darüber hinaus festgestellt, dass bei der eingesetzten, gummierten Sitzstange die gleichmäßigste Druckverteilung erreicht wurde und dass sich diese Sitzstange aufgrund ihrer flexiblen Eigenschaft möglicherweise am besten eignet, sich den anatomischen Begebenheiten einer Henne während der Sitzstangennutzung anzupassen. Ein erster Prototyp einer ergonomischen Sitzstange soll in Kürze in einer Praxisuntersuchung getestet werden, um die Eigenschaften auf die Brustbein- und Fußballengesundheit unter Praxisbedingungen zu validieren. Der Antrag auf Erteilung eines Patents für eine „Sitzstange für Vögel“ wurde am 10.06.2009 gestellt (patent pending).

STAUBBADEN HENNEN IN LEGEMEHL?

Neben den Anforderungen an ein ungestörtes Ruheverhalten auf Sitzstangen ist das Staubbadeverhalten von Legehennen ebenfalls vom Gesetzgeber aufgegriffen worden. Gemäß den

Vorgaben der zweiten VO zur Änderung der TierSchNutzV (2006) müssen in Deutschland seit Beginn dieses Jahres alle Haltungseinrichtungen für Legehennen mit einem Einstreubereich ausgestattet sein, der mit „geeignetem“ Einstreumaterial versehen ist und artgemäßes „Picken, Scharren und Staubbaden“ ermöglicht. Da ab 2012 EU-weit ähnliche Anforderungen gelten, stellt sich die Frage, welche Art des Einstreumaterials tatsächlich „geeignet“ ist, den in der Verordnung genannten Verhaltensansprüchen der Hennen zu entsprechen. Gegenwärtig wird in der Kleingruppenhaltung herkömmliches Legemehl als Einstreu verwendet, welches in kleinen Portionen auf Kunstrasenmatten (Astroturf) angeboten wird. Diese Variante ist aus technischen Gründen vorteilhaft, da Futterkette und Zuleitungsrohr für die Befüllung des Einstreubereiches gekoppelt sind. In verschiedenen Untersuchungen mit unterschiedlichen Einstreumaterialien wurde eine Präferenz der Hennen für Sand oder Torf festgestellt, wobei diese Materialien für eine Anwendung in der Kleingruppenhaltung aus technischen Gründen nicht geeignet sind. Daher wurde in unserem Institut anhand eines Wahlversuchs erstmalig die Nutzung von Legemehl als Einstreumaterial untersucht (Scholz *et al.*, 2009). Die Hypothese war, dass Legemehl aufgrund seiner feinen, sandähnlichen Struktur sowohl zum Staubbaden als auch aufgrund der nutritiven Eigenschaften zur Nahrungssuche von den Hennen bevorzugt werden würde. In zwei Durchgängen wurden jeweils 72 Hennen (LSL, LB) in zwölf Abteilen gehalten (6 Tiere einer Herkunft je Abteil). Die Abteile waren mit Kunststoffgitterböden ausgelegt und verfügten über jeweils vier Einstreubuchten, in denen den Hennen parallel herkömmliches Legemehl, Holzspäne, Lignozellulose (SoftCell®, Agromed Austria GmbH, Kremsmünster) und eine Astroturfmatte ohne Einstreu angeboten wurde (Abb. 3).



Abb. 3: Hennen in einem experimentellen Abteil, in dem sie zwischen verschiedenen Einstreusubstraten wählen konnten.

Anhand von Videoaufzeichnungen wurde jeweils in den Lebenswochen 21, 24 und 27 der Hennen das Staubbade- und Nahrungssuchverhalten in den jeweiligen Substraten protokolliert. Entgegen den Erwartungen zeigte sich, dass

die Hennen zum Staubbaden signifikant die Lignozellulose bevorzugten, während Legemehl und Astroturfmatten am wenigsten genutzt wurden (Abb. 4).

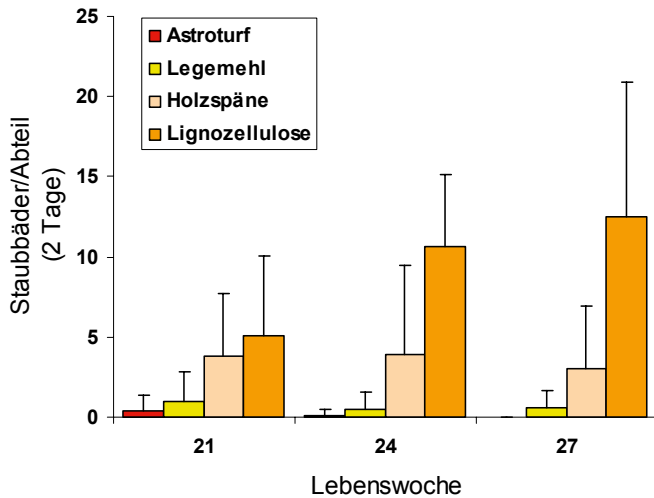


Abb. 4: Durchschnittliche Anzahl an Staubbädern pro Abteil (6 Hennen) über zwei Tage in den vier verschiedenen Substraten (Lebenswochen 21, 24, 27, LSL und LB Hennen) (Mean \pm Std, $p < 0,001$).

Zur Nahrungssuche bevorzugten die Hennen jedoch signifikant am häufigsten das Legemehl, gefolgt von Holzspänen, Lignozellulose und Astroturfmatten. Die geringe Präferenz von Legemehl zum Staubbaden kann möglicherweise auf dessen Fettgehalt zurückgeführt werden, der einer Entfettung des Gefieders beim Staubbaden entgegengewirkt haben könnte. Für eine unzureichende Funktion des Legemehls zur Gefiederpflege spricht auch, dass das Staubbaden in Legemehl, sofern es dort gezeigt wurde, tendenziell am längsten dauerte. Die Bevorzugung des Legemehls zur Nahrungssuche dürfte auf den fehlenden Nährstoffgehalt der anderen Substrate zurückzuführen sein. Um den möglichen Einfluss des Fettgehaltes im Legemehl auf das Staubbadeverhalten hin zu testen, wurde eine Folgeuntersuchung mit identischem Versuchsdesign durchgeführt (Urselmans *et al.*, 2009). Abweichend von der ersten Untersuchung wurde den Hennen zeitgleich experimentell entfettetes Legemehl (0,8 % Fett), herkömmliches Legemehl (4,2 % Fett) und ein mit Fett angereichertes Legemehl (15,7 % Fett) zum Staubbaden angeboten. Die Hypothese dieser Studie war, dass Legehennen zum Staubbaden das annähernd fettfreie Legemehl bevorzugen würden und am wenigsten das mit Fett angereicherte Legemehl, da letzteres am wenigsten für eine Entfettung des Gefieders geeignet sein dürfte. Der Versuch wurde über einen Durchgang durchgeführt. Die Ergebnisse konnten die aufgestellte Hypothese bestätigen. Hennen beider Linien bevorzugten zum Staubbaden das entfettete Le-

gemehl, gefolgt von „normalem“ und dem fettangereicherteren Legemehl. Um die Wirkung von Futtermehl hinsichtlich der Gefiederpflege untersuchen zu können, etablieren wir gegenwärtig eine Methodik, um in einer Folgestudie den Lipidgehalt des Gefieders vor und nach einem Staubbad in Legemehl und anderen Substraten bestimmen zu können.

LITERATUR

- PICKEL, T. 2009. „Ergonomische“ Sitzstangen für Legehennen, 3. Celler Fachgespräch, Celle, 23. September 2009.
- RÖNCHEN, S., B. SCHOLZ, M. HEWICKER-TRAUTWEIN, H. HAMANN, AND O. DISTL. 2008. Foot pad health in Lohmann Selected Leghorn and Lohmann Brown laying hens kept in different housing systems with modified perch design. *Arch Geflügelk* 72:97-105.
- SCHOLZ, B., S. RÖNCHEN, H. HAMANN, AND O. DISTL. 2009. Bone strength and keel bone status of two layer strains kept in small group housing systems with different perch configurations and group sizes. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:249-256.
- SCHOLZ, B., S. URSELMANS, J.B. KJAER, AND L. SCHRADER. 2009. Preferences of laying hens for different dustbathing substrates. In: *Proceedings of 43rd Congress of the International Society of Applied Ethology (ISAE)*, Cairns, Australia, 6th -10th July 2009, p 72.
- SCHOLZ, B., S. RÖNCHEN, H. HAMANN, M. HEWICKER-TRAUTWEIN, AND O. DISTL. 2008. Keel bone condition in laying hens: a histological evaluation of macroscopically assessed keel bones. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 121:89-94.
- SCHRADER, L., AND B. MÜLLER. 2009. Night-time roosting in the domestic fowl: The height matters, *Appl Anim Behav Sci* 121:179-183.
- URSELMANS, S., B. SCHOLZ, J.B. KJAER, AND L. SCHRADER. 2009. Preferences of laying hens for different dustbathing substrates. In: *Book of Abstracts, ISAE Regional Meeting, Vienna, Austria, 25th - 26th September 2009*, p. 7.

Weitere Literatur kann bei den Verfassern angefordert werden.

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen (IBIZ)

SCHWEINEBRUCELLOSE – DIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN DES NRL BRUCELLOSE IM ZUSAMMENHANG MIT AUSBRÜCHEN IN MECKLENBURG-VORPOMMERN

Melzer F¹., Teifke J. P.²

¹Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, ²Institut für Infektionsmedizin

Bei der Brucellose handelt es sich um eine zoonotische Infektionskrankheit hervorgerufen durch Bakterien verschiedener Spezies der Gattung *Brucella*. Für die Erkrankungen bei den wichtigsten landwirtschaftlichen Nutztieren in Europa sind *Brucella (B.) abortus* (Rind), *B. melitensis* (Schaf, Ziege) und *B. suis* (Schwein) verantwortlich.

Deutschland ist offiziell frei von Brucellose der Rinder, Schafe und Ziegen. Die Brucellose der Schweine wird durch die *B. suis* Biovare 1 bis 3 hervorgerufen. Während die Biovare 1 und 3 vor allem in den USA und Ozeanien vorkommen und sich durch eine hohe Virulenz für den Menschen auszeichnen, ist der Biovar 2 vor allem in Europa in den Populationen von Wildschwein und Hase endemisch. In der täglichen Routinediagnostik hat das Nationale Referenzlabor (NRL) für Brucellose u.a. die Aufgabe, im Rahmen der serologischen Überwachungsuntersuchungen erzielte sogenannte „nichtnegative“ Befunde der regionalen Untersuchungseinrichtungen abzuklären.

In den letzten beiden Jahren kam es zu einer Reihe von Ausbrüchen porciner Brucellose in Mecklenburg-Vorpommern, die alle in Freilandhaltungen zu verzeichnen waren und hier chronologisch nach dem Zeitpunkt der amtlichen Feststellung vorgestellt werden.

AUSBRUCH 1:

Mitte Juni 2008 erhielten wir Serumproben aus einem Schweinebestand Ostvorpommerns, die im Zuge einer Bestandsstichprobenuntersuchung ein „nichtnegatives“ Ergebnis im zuständigen Labor des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF-MV) Rostock aufwiesen. Alle vier Proben waren im Rose-Bengal-Test (RBT), in der Serumlangsamagglutination (SLA) und in der Komplementbindungsreaktion (KBR) positiv zu bewerten. Die Grenzwerte für positive Ergebnisse liegen bei 30 Internationalen Einheiten pro Milliliter Serum (IE/ml) für die SLA und 20 Sensitiven Einheiten pro Milliliter Serum (SensE/ml) für die KBR. Das Vorliegen einer Brucellose war somit nicht auszuschließen (siehe Diagramm 1, Seren 1 bis 4). Anfang Juli erhielten wir erneut Seren aus diesem Bestand, bei denen wir zu ähnlichen Resultaten kamen (Seren 5 bis 9). Da unsere Ergebnisse die Resultate des Einsenderlabors bestätigten, wurde der Seuchenausbruch für den Bestand amtlich festgestellt. Im Verlauf des Geschehens wurden weitere Serumproben aus dem Bestand untersucht (siehe Diagramm 1, Seren 10 bis 30). Mit Ausnahme der Seren 5 und 29 reagierten alle Proben positiv im RBT. Die Seren 5, 29 und 30 wurden negativ in der KBR getestet.

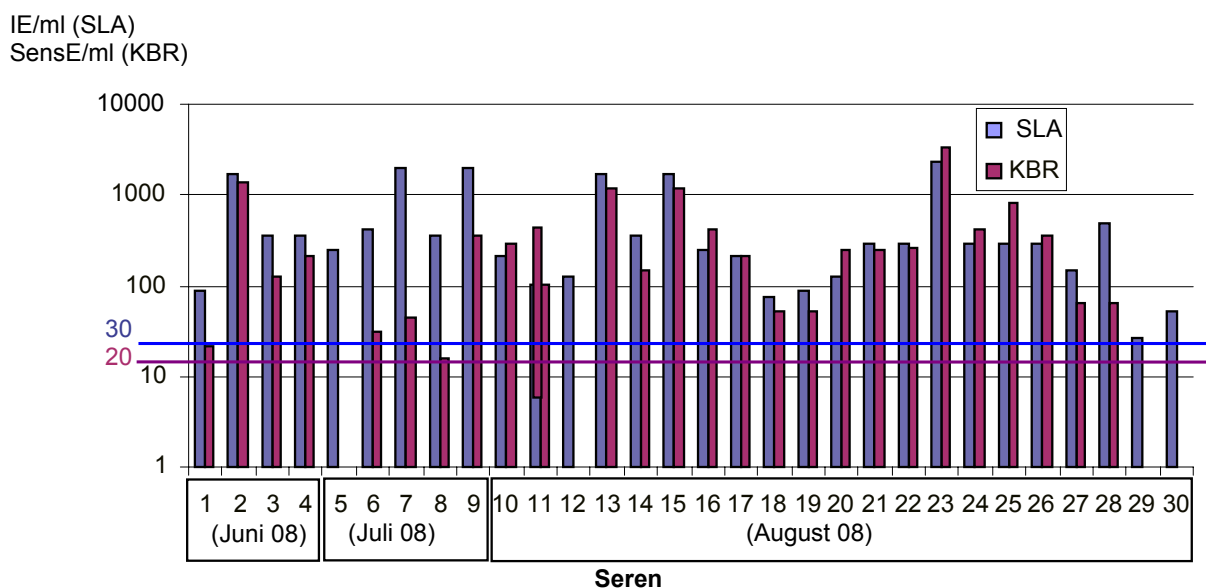


Abb. 1:
Ergebnisse der KBR und SLA aus Bestand 1.

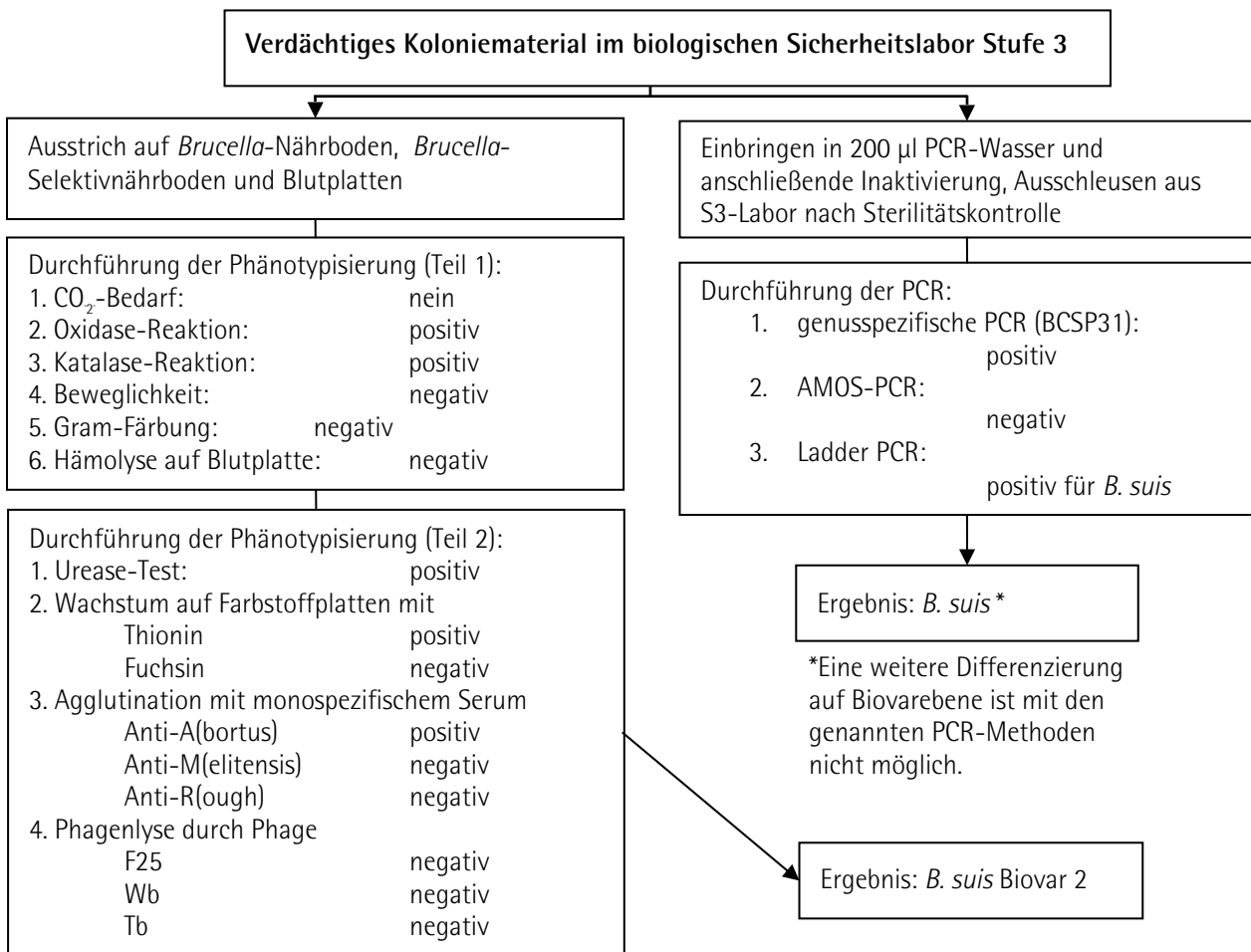


Abb. 2: Ablauf der Typisierung von *Brucella*-verdächtigen Isolaten am NRL Brucellose mit Ergebnissen für *B. suis* Biovar 2 (aus Ausbruch 1).

AUSBRUCH 2

Um mögliche Quellen der Infektion feststellen und eine mögliche Ausbreitung der Infektion auf andere Bestände vermeiden zu können, wurden serologische Untersuchungen in Zulieferbetrieben des Bestandes 1 durchgeführt. Im Rahmen einer solchen Bestandsstichprobe wurde ein zweiter Betrieb auffällig. Von den zehn an das NRL gesendeten Proben waren zwei Seren im RBT, der KBR und der SLA als positiv einzustufen. Eine Probe reagierte nur in der SLA und der KBR positiv. Zwei Seren waren nur in der SLA positiv. Ein verdächtiges Isolat konnte auch in diesem Fall als *B. suis* 2 identifiziert werden.

AUSBRUCH 3, 4 UND 5

Aus einem dritten Standort wurden Proben zur Abklärung erhöhter Abortraten an das LALLF-MV nach Rostock verschickt. Es wurden auch hier verdächtige Bakterienkolonien

angezüchtet, die am NRL wiederum als *B. suis* 2 bestätigt werden konnten. Nachfolgend wurden von uns 40 Seren dieses Standortes untersucht, von denen zwei im RBT, fünf in der SLA und vier in der KBR positiv waren. Auf Grund der serologischen Ergebnisse, der positiven Anzucht und der epidemiologischen Situation, d. h. der engen Vernetzung der drei Betriebe, wurde auch hier der Ausbruch der Brucellose amtlich festgestellt.

Zwei Sauen aus diesem Ausbruchsgeschehen wurden einer Sektion zugeführt. Beide Tiere waren in RBT, SLA und KBR deutlich positiv (Tab.1). Nur bei einer der beiden Sauen (Sau 1) konnten mit granulomatösen Entzündungen am Uterus pathologische Veränderungen festgestellt werden, wie sie durch eine Brucellose verursacht werden können.

Leider konnte ein solcher Zusammenhang durch die negativen Ergebnisse der PCR und die erfolglosen Isolierungsversuche des Erregers aus diesen Geweben nicht bewiesen werden. Jedoch konnte aus den Leberlymphknoten beider Tiere *B. suis* 2 isoliert werden.



Abb. 3: Uterus, Schwein (makroskopisch): Multifokale miliare granulomatöse Endometritis. Zahlreiche scharf abgegrenzte Entzündungsherde finden sich in der Uterusschleimhaut und wölben diese geringgradig vor (Pfeile). Nur wenige dieser Granulome schimmern durch die Uteruswand durch und sind deshalb erst nach Eröffnen des Organs zu erkennen.

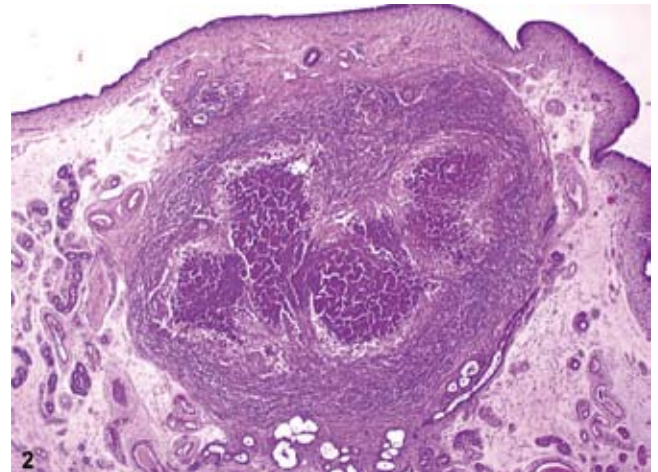


Abb. 4: Uterus, Schwein (histologisch): Anschnitt eines in der Submukosa des Endometriums lokalisierten durch *Brucella suis* hervorgerufenen granulomatös-nekrotisierenden Entzündungsherdes.

	SLA in IE/ml	KBR in SensE/ml	RBT
Sau 1 Serum	297	297	positiv
Sau 1 Fleischsaft Zwerchfell	210	37	positiv
Sau 2 Serum	2378	2378	positiv
Sau 2 Fleischsaft Zwerchfell	1682	177	positiv

Tabelle 1: Ergebnisse der serologischen Untersuchung von zwei Sauen aus einem Brucellosebestand (dritter Standort).

AUSBRUCH 4:

In einer weiteren Freilandhaltung wurden bei angeordneten serologischen Überwachungsuntersuchungen wiederum positiv reagierende Tiere nachgewiesen und der Ausbruch der Brucellose offiziell festgestellt. Auch in diesem Fall konnte ein Erregernachweis von *B. suis* 2 die serologischen Ergebnisse bestätigen.

WEITERE UNTERSUCHUNGEN

Um den Verdacht des möglichen Eintrags des Erregers aus der Wildschwein- oder Hasenpopulation in die Freilandhaltungen auszuschließen oder zu bestätigen, wurden aus Probenmaterial von erlegten Tieren Anzuchtversuche durchgeführt. Auch dabei wurde bisher mehrfach *B. suis* 2, allerdings nur aus Wildschweinen, durch das LALLF-MV in Rostock isoliert. Am NRL wurden die vorliegenden Haus- und Wildschweinisolat genotypisiert. Es fand die „Multi Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis“ (MLVA)

Anwendung (Le Fleche *et al.*, 2006), wie sie am NRL auch für die Suche nach möglichen Infektionsquellen bei humanen Brucellosefällen genutzt wird (Schulze zur Wiesch *et al.*, 2009). Dabei wird an insgesamt 16 verschiedenen Stellen (sog. Loci) im Genom, an denen geeignete repetitive Sequenzen vorhanden sind, die Anzahl dieser Wiederholungen mittels der Längebestimmung von PCR-Amplifikaten ermittelt.

Der MLVA-Genotyp wird als eine Abfolge von Zahlen, die die Anzahl der aus der Amplifikatlänge berechneten Repeats widerspiegeln, angegeben. Nach Anzahl der Wiederholungen werden die Loci in die Gruppe 1 (sog. Minisatelliten bis ca. 150 Basenpaare mit einer geringeren Variabilität) und eine Gruppe 2 (sog. Mikrosatelliten von 6-9 Basenpaaren mit hoher Variabilität) mit hoher Differenzierungsmöglichkeit eingeteilt. Diese Gruppe 2 wird auch als so genanntes „forensisches Panel“ bezeichnet und ist für Ausbruchsuntersuchungen von besonderer Aussagekraft.

Bei den Isolaten aus verschiedenen Ausbrüchen sind deutliche Unterschiede im Genotyp festzustellen. Verschiedene Isolate aus einem betroffenen Bestand (Ausbruch 3) zeigen keine oder nur geringfügige Unterschiede von einer Wiederholung. Mangels Festlegungen in den bisher zu dieser Methodik publizierten Arbeiten sind wir bei unseren Auswertungen davon ausgegangen, dass Isolate mit einer Abweichung von einer Wiederholung nach oben oder unten bezogen auf die Loci der Gruppe 2 noch als identisch bewertet werden können. Ob diese Differenzen evtl. methodisch bedingt sind, d. h. es Abweichungen gegenüber den auf Grundlage der sequenzierten Referenzstämmen festgelegten Werten gibt, muss noch geklärt werden. Dazu werden nun abweichende Loci bei verschiedenen *Brucella*-Isolaten sequenziert.

Bei der Genotypisierung der bislang vorliegenden 15 *Brucella*-Isolate von Wildschweinen konnten bisher nur zwei Isolate festgestellt werden, die nach den o. g. Kriterien als identisch einzustufen sind. Außerdem waren der MLVA Typ eines Wildschweinisolats aus 2008 und eines 2004 bei einem Ausbruchsgeschehen im selben Bundesland isolierten Stammes identisch. Dieser MLVA Typ könnte also aus dem Wildtierreservoir eingetragen worden sein. Trotz weiterer epidemiologischer Analysen konnten keine eindeutigen Eintragswege in die Bestände festgestellt werden. Der lange Zeitraum zwischen beiden Isolierungen deutet darauf hin, dass der Erreger relativ stabil in der Wirtspopulation überdauern kann und die Loci der Gruppe 2 ein geeignetes Instrumentarium für epidemiologische Analysen sind.

Auch im Jahr 2009 kam es wieder zur amtlichen Feststellung von Brucelloseausbrüchen in Freilandhaltungen von Schweinen, wobei bisher nur in einem Fall eine Erregerisolierung mit anschließender Identifizierung gelang. Die Untersuchungen zum zweiten Ausbruch in 2009 und der Vergleich mit weiteren Isolat von Wild- und Hausschweinen aus weiteren Bundesländern und europäischen Staaten dauern derzeit noch an.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Sicht des Referenzlabors stellen Freilandhaltungen von Schweinen ein besonderes Risiko für einen möglichen Erregereintrag und damit einen Brucelloseausbruch dar. Die vorhandenen diagnostischen Möglichkeiten sind geeignet, eine stattgefunden Infektion im Bestand mit ausreichender Sicherheit nachzuweisen. Inwiefern falsch positive serologische Reaktionen zu einer Fehlinterpretation führen können, lässt sich zurzeit nicht mit Sicherheit sagen. Da alle epidemiologisch und serologisch untersuchten Ausbrüche durch einen Erregernachweis verifiziert werden konnten, besteht für die geschilderten Fälle kein Zweifel an den Ergebnissen der serologischen Stichprobenuntersuchungen. Unabhängig davon sei darauf hingewiesen, dass alle derzeit verfügbaren serologischen Methoden für die Brucellose-diagnostik nur im Rahmen von Bestandsuntersuchungen mit geeignetem Stichprobenumfang eine ausreichende Sicherheit haben. Die Entwicklung von spezifischeren Testmethoden – gerade auch für die Einzeltierdiagnostik – ist allerdings nicht nur für das Schwein dringend notwendig. Standardisierte Validierungsstudien mit einer ausreichend großen Anzahl an geprüften, nachweislich positiven Kontrollseren werden in Zukunft durch das NRL in Zusammenarbeit mit anderen Referenzlaboren in Europa durchgeführt werden, um eine erhöhte diagnostische Sicherheit in der *Brucella*-Diagnostik erreichen zu können.

Die Genotypisierung mittels MLVA ist eine geeignete Methodik, um Ausbruchsgeschehen epidemiologisch analysieren zu können. Die Gruppe 2 der einbezogenen Loci hat

eine ausreichende Variabilität, um unterschiedliche Stämme identifizieren zu können, scheint aber gleichzeitig so stabil zu sein, dass einzelne Stämme auch über einen längeren Zeitraum einen stabilen MLVA-Typ erzeugen. Nach welchen Kriterien geringgradige Abweichungen des MLVA-Typs von einer Wiederholung in den Loci der Gruppe 2 gewichtet werden, muss in den geeigneten Gremien noch diskutiert werden.

Eine Publikation zur Schweinebrucellose in Freilandhaltungen Mecklenburg-Vorpommerns ist derzeit mit Federführung der an den Untersuchungen beteiligten Kollegen Mecklenburg-Vorpommerns in Vorbereitung. Eine ausführliche wissenschaftliche Darstellung und Bewertung der Schweinebrucellose wurde im Jahr 2009 durch die EFSA (European Food Safety Authority) veröffentlicht (siehe Literaturangaben).

LITERATUR:

- LE FLECHE, P., I. JACQUES, M. GRAYON, S. AL DAHOUC, P. BOUCHON, F. DENOEUDE, K. NOCKLER, H. NEUBAUER, L. A. GUILLOTEAU, AND G. VERGNAUD. 2006: Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 6:9.
- SCHULZE ZUR WIESCH, J., D. WICHMANN, I. SOBOTKA, H. ROHDE, G. SCHMOOCK, R. WERNERY, S. SCHMIEDEL, D. BURCHARD, AND F. MELZER. 2009. Genomic Tandem Repeat Analysis Proves Laboratory-Acquired Brucellosis in Veterinary (Camel) Diagnostic Laboratory in the United Arab Emirates. *Zoon Publ Health* [Epub ahead of print; doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01258.x].
- SCIENTIFIC OPINION OF THE PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE (AHAW) ON REQUEST FROM THE COMMISSION ON PORCINE BRUCELOSIS (*BRUCELLA SUI*S). 2009. *The EFSA Journal* 1144:1-112

Institut für molekulare Pathogenese (IMP)

RINDERTUBERKULOSE – NEUE ANSÄTZE IN DIAGNOSTIK UND TYPISIERUNG

Köhler, H., Moser, I., Möbius, P., Gierke, F., Menge, C.

EINLEITUNG

Die Rindertuberkulose (TB) ist eine chronische Infektionskrankheit, die durch *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) und *M. caprae*, Erreger des *Mycobacterium (M.) tuberculosis*-Komplexes (MTC), hervorgerufen wird. *M. bovis* und *M. caprae*, letzteres bis 2003 taxonomisch als Subspezies von *M. bovis* eingeordnet, sind in Deutschland etwa zu gleichen Teilen für Tuberkulose-Infektionen des Rindes verantwortlich. Beide Erreger besitzen ein breites Wirtsspektrum einschließlich des Menschen. In Staaten mit hoher Prävalenz beim (Nutz-) Tier und unzureichenden lebensmittelhygienischen

Maßnahmen (z. B. Pasteurisierung) spielen *M. bovis*- und *M. caprae*-Infektionen eine Rolle im humanen TB-Geschehen. Weltweit wird der Anteil „boviner TB“-Fälle des Menschen auf etwa zehn Prozent geschätzt. Laut WHO gehört die bovine Tuberkulose zu den sieben wichtigsten vernachlässigten endemischen Zoonosen.

Infizierte Tiere bleiben über lange Zeit klinisch unauffällig. Leistungsrückgang unklarer Genese, Abmagerung („Schwindsucht“) oder chronischer, therapieresistenter Husten können auf die Erkrankung hinweisen. Die Infektion er-

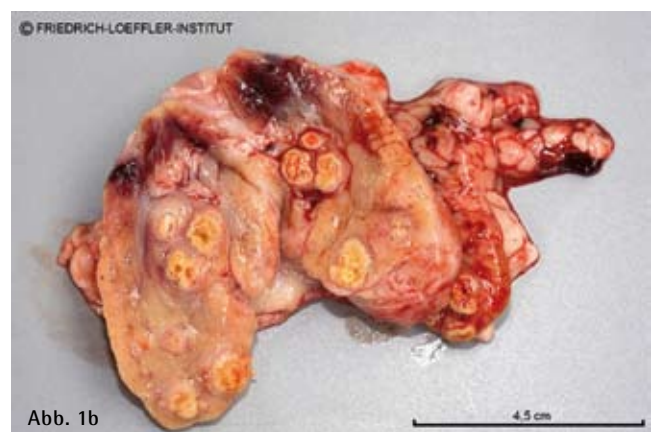
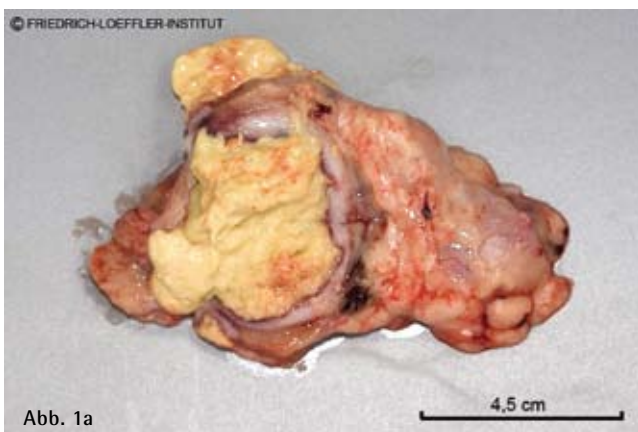


Abb. 1: Tuberkulöse Veränderungen an Lymphknoten (a, b), Lunge (c), Leber und Peritoneum (d) natürlich *M. bovis*-infizierter Rinder.

folgt aerogen oder alimentär. Zunächst entwickelt sich eine granulomatöse Entzündung mit knötchenförmigen Veränderungen (Tuberkel) an der Eintrittspforte und in den regionalen Lymphknoten (Primärkomplex). Die Veränderungen finden sich je nach Infektionsweg an den Kopflymphknoten, im Respirations- oder im Gastrointestinaltrakt (Abb. 1). Danach treten verschiedene Verlaufsformen auf. Bei der Frühgeneralisation bilden sich granulomatöse Läsionen in verschiedenen Organen, u. a. in der Leber und der Niere sowie an den serösen Häuten (Miliartuberkulose). Die chronische Organtuberkulose betrifft meist ein Organ, z. B. die Lunge. In der terminalen Niederbruchsphase kann es zur Spätgeneralisation kommen.

Die Rindertuberkulose verursacht weltweit erhebliche volkswirtschaftliche Schäden durch negative Auswirkungen auf die Tiergesundheit und -produktivität und die erforderlichen Bekämpfungsmaßnahmen zum Schutz von Mensch und Tier.

AKTUELLE SEUCHENSITUATION BEI LANDWIRTSCHAFTLICHEN NUTZTIEREN IN DEUTSCHLAND

Deutschland besitzt gemäß Entscheidung der Kommission 97/76/EG den Status „amtlich frei von Rindertuberkulose“, d. h. über 99,9 Prozent der Rinderbestände sind TB-frei. Bis 1997 wurden alle Bestände regelmäßig mit der Tuberkulinprobe (Hauttest) untersucht. Danach war es nach Auffassung des Gesetzgebers vertretbar, auf ein Überwachungssystem mit ungleich geringerem Aufwand auf Basis der amtlichen Fleischuntersuchung in Verbindung mit epizootologischen Nachforschungen überzugehen. Allerdings wurde die Seuche in Deutschland nicht vollständig getilgt. Seit 1995 waren jährlich zwischen zwei und zwölf Ausbrüche zu verzeichnen, die vor allem in Gebieten mit hoher Rinderdichte auftraten (Abb. 2).

Im Jahre 2008 wies ein TB-Ausbruch in Niedersachsen auf mögliche Schwachpunkte der aktuellen Überwachung hin. Bei der Hausschlachtung eines Rindes wurde der Schlachtkörper wegen erheblicher Veränderungen als untauglich beurteilt. Labordiagnostisch konnte *M. bovis* nachgewiesen werden. Bei der nachfolgenden Tuberkulinisierung des Gesamtbestandes reagierten rund 60 Prozent der Rinder positiv. Im Rahmen der epidemiologischen Rückverfolgung wurden elf Kontaktbetriebe mit Hauttest-positiven Tieren identifiziert. Die Verschleppung der Infektion erfolgte mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Tierhandel, bei zwei Beständen konnten Weidekontakte als Einschleppungsweg nicht ausgeschlossen werden. Die Handelskontakte, die zu der Verschleppung führten, lagen bis in das Jahr 2002 zurück. Die Infektion wurde jedoch bis Februar 2008 weder im „mutmaßlichen Indexbetrieb“ noch in Betrieben, die Sekundärausbrüche zu verzeichnen hatten, erkannt.

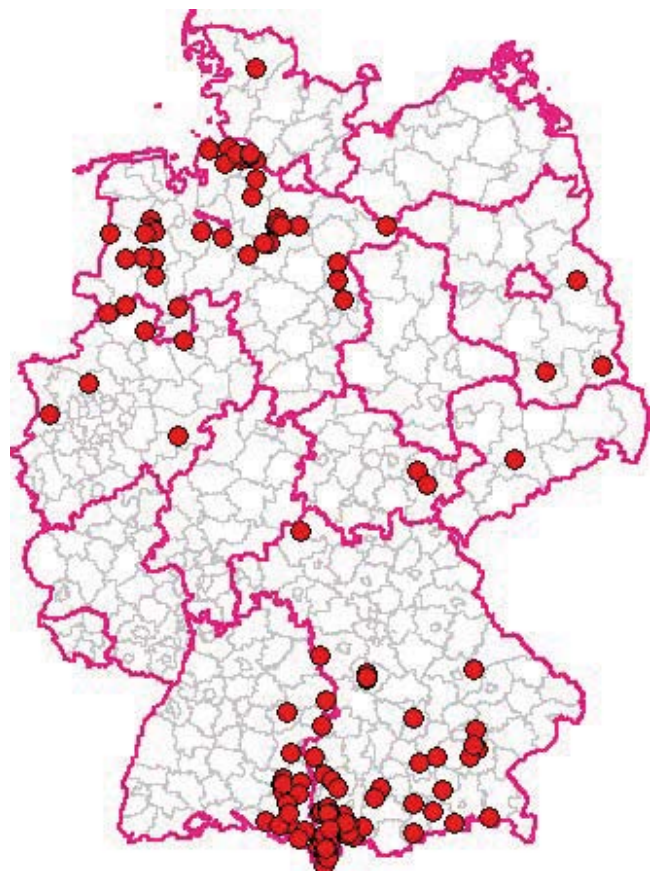


Abb. 2: Rindertuberkulose-Fälle in Deutschland zwischen 01.01.1995 und 21.12.2009 (Quelle: TSN).

VORKOMMEN VON MYKOBAKTERIEN-INFESTIONEN BEI WILDTIEREN IN DEUTSCHLAND

Wildtiere wie Dachs, Weißwedelhirsch, Fuchskusu, Wildschwein oder Büffel stellen in vielen Regionen der Erde, z. B. in England, Irland, USA, Neuseeland, Spanien und Südafrika ein dauerhaftes Reservoir für Erreger des MTC dar. Bemühungen, die Tuberkulose aus den Rinderbeständen zu eliminieren, erleiden hier immer wieder Rückschläge. In Deutschland konnte in den letzten Jahren bei Karnivoren und Omnivoren (Dachs, Marder, Wildschwein) vereinzelt *M. microti*, beim Rothirsch in zwei Fällen (2005, 2007) *M. caprae* nachgewiesen werden. Die Fundorte der Hirsche lagen nahe der bayerisch-österreichischen Grenze. Die Isolate wiesen molekulare Charakteristika auf, die denjenigen österreichischer Isolate vom Rothirsch ähnlich waren. *M. caprae* ist in Europa bei Wildwiederkäuern verbreitet (u. a. Österreich, Frankreich, Spanien, Tschechische Republik; Prodingler *et al.*, 2005). Die Ergebnisse der molekularen Typisierung weisen darauf hin, dass direkte bzw. indirekte Kontakte zu Wildtierreservoirs gerade während der Almaftriebsaison für einen Teil des endemischen Geschehens in Süddeutschland

verantwortlich gemacht werden können. *M. caprae* wurde jedoch auch bei Rindern aus Thüringen und Niedersachsen nachgewiesen (Erler *et al.*, 2003).

Im Rahmen einer Studie des Nationalen Referenzlabors (NRL) zur Tuberkulose bei frei lebenden Zerviden in den Jahren 2002 bis 2006 wurden Kopflymphknoten von 1.022 Tieren aus allen Regionen des Landes bakteriologisch untersucht. Bei 18,3 Prozent der Tiere wurden atypische Mykobakterien isoliert. In 80,7 Prozent der Fälle wurden die Isolate *M. avium*, überwiegend der Subspezies *hominissuis*, zugeordnet. In keinem Fall konnte jedoch *M. bovis* oder *M. caprae* nachgewiesen werden.

In Deutschland besteht derzeit kein nennenswertes Wildtierreservoir für Erreger des MTC.

AUFDECKUNG EPIDEMIOLOGISCHER ZUSAMMENHÄNGE DURCH MOLEKULARE TYPISIERUNG

Die Aufklärung der Verbreitung von Mykobakterien in geographischer und in zeitlicher Dimension ist nur durch molekulare Typisierung möglich. Die Erreger des MTC sind zwar taxonomisch Mitglieder einer Spezies, da sie sich im 16S rRNA-Gen nicht unterscheiden. Für molekularepidemiologische Untersuchungen eignen sich aber die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) auf der Basis des MTC-spezifischen Insertionselementes (IS) 6110, das Spoligotyping und die VNTR-Typisierung.

Bei der RFLP-Analyse wird die Anzahl und Verteilung der Kopien des IS6110 im Genom untersucht. Die Methode verliert jedoch auf Grund des methodischen Aufwandes, der Schwierigkeiten bei der Standardisierbarkeit und Automatisierung sowie der mangelnden Eignung für *M. bovis* (geringe Anzahl von IS6110 Kopien pro Genom) an Bedeutung. Das Spoligotyping (Kamerbeek *et al.*, 1997) nutzt den Polymorphismus der chromosomalen *direct repeat* (DR) Region, die durch eine variable Anzahl repetitiver Oligonukleotid-Sequenzen mit ebenso vielen dazwischen gelagerten nicht-repetitiven DNA-Elementen (Spacer) charakterisiert ist. Der Polymorphismus besteht in der Anzahl der vorhandenen Spacer, nicht in den Sequenzen der DR oder der Spacer selbst. In der Regel wird die An- bzw. Abwesenheit der Spacer 1 – 43 analysiert. Die Methode bedient sich zweier Schritte, (1) der Generierung eines Biotin-markierten Amplifikates, dessen Anfang und Ende durch die DR-Sequenz bestimmt ist, aus dem zu untersuchenden Stamm und (2) einer DNA-DNA-Hybridisierung dieses Amplifikates mit den auf einer Membran fixierten Spacer-Oligonukleotiden 1 – 43 (Abb. 3). Die Hybridisierungssignale generieren auf einem Röntgenfilm für jede Spezies des MTC charakteristische Muster, die innerhalb bestimmter Grenzen auch stammspezifische Variationen aufweisen können (Abb. 4), so dass auch unterhalb der Speziesebene Isolate differenziert werden können. Die Muster werden in einen standardisierten Zahlencode umgeschrieben, der in einer Datenbank

hinterlegt werden kann (www.mbovis.org), so dass globale Vergleichsuntersuchungen möglich sind. Da die DR-Region jedoch relativ gut konserviert ist, ist das diskriminatorische Potential der Methode begrenzt.

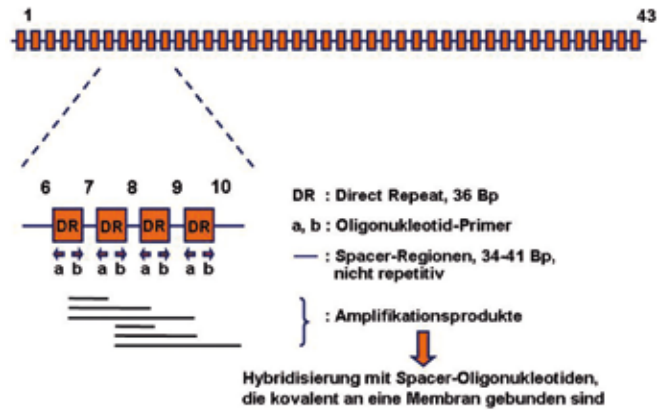


Abb. 3: Grundlagen des Spoligotypings von Erregern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (modifiziert nach Kamerbeek *et al.*, 1997).

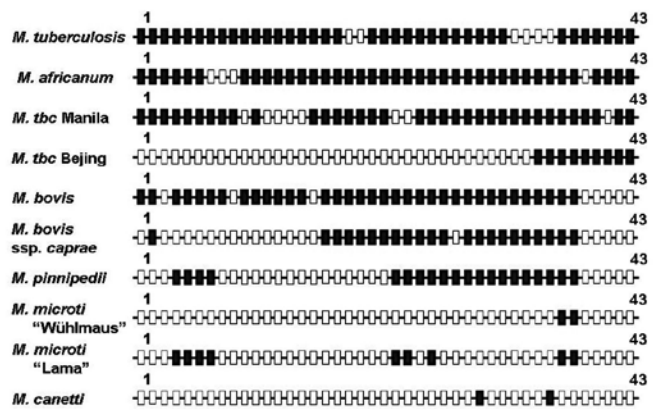


Abb. 4: Repräsentative Spoligotypen von Erregern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes

Über eine größere Auflösungskraft verfügt die Methode der MIRU/VNTR-Typisierung (*mycobacterial interspersed repetitive unit / variable number of tandem repeat*), 1998 erstmals für die molekulare Differenzierung von MTC-Isolaten beschrieben (Frothingham *et al.*, 1998). Heute werden bis zu 26 Loci für die Untersuchung empfohlen, wobei bei Isolaten von Tieren oft nur sechs Loci analysiert werden. In einem Land wie Deutschland mit niedriger endemischer Prävalenz und hoher Wahrscheinlichkeit, dass TB-Erreger durch Zukauf von Tieren in das Land gelangen können, besteht jedoch die Notwendigkeit, das Basis-Panel von sechs Loci zu erweitern. Bisher durchgeführte Untersuchungen des Referenzlabors an 55 epidemiologisch unabhängigen MTC-Isolaten zeigen,

dass ein Panel von etwa zehn Loci für eine sichere Differenzierung von MTC-Isolaten erforderlich ist.

Die in Deutschland isolierten *M. bovis*-Isolate können in der überwiegenden Mehrzahl fünf, die *M. caprae*-Isolate drei Spoligotypen zugeordnet werden. Der Spoligotyp des *M. bovis*-Ausbruchs in Niedersachsen 2008 konnte bereits im Jahr 2000 in einem Ausbruch in Niedersachsen nachgewiesen werden, ebenso bei einem aus Belgien importierten Rind im Jahr 2007. Das VNTR-Muster des Isolates aus Belgien wies aber mit sechs von 26 Loci mehr Unterschiede zu dem Ausbruchsisolat von 2008 auf als das Isolat aus dem Jahr 2000 mit lediglich zwei Loci. Dies legt die Reaktivierung einer einheimischen Infektionsquelle als Ursache für den Ausbruch nahe. Dagegen ist ein Teil der in Süddeutschland isolierten „endemischen“ *M. caprae*-Stämme mit einem der in Österreich vorkommenden VNTR-Cluster nahezu identisch, was auf ein grenzüberschreitendes Infektionsgeschehen hinweist.

Der Anteil „boviner TB“-Fälle beim Menschen ist in Deutschland von 10 – 15 Prozent aller TB-Fälle in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts auf etwa 1,3 Prozent zu Beginn des 21. Jahrhunderts zurückgegangen. Dabei spiegelt sich das Nord-Süd-Gefälle beim Vorkommen von *M. caprae* beim Rind auch beim Menschen wider. Etwa 80 Prozent der humanen *M. caprae*-Infektionen wurden im Süden Deutschlands (BW, BY) nachgewiesen. Die Mehrzahl der Patienten war 60 Jahre und älter (Kubica *et al.*, 2003). Bei den im Inland nachgewiesenen Fällen handelt es sich also vermutlich überwiegend um reaktivierte Infektionen aus der Zeit vor der Bekämpfung der Rindertuberkulose. Das aktuelle Risiko des Menschen, sich in Deutschland mit *M. bovis* oder *M. caprae* zu infizieren, ist generell als gering anzusehen, im Einzelnen aber schwierig zu bewerten. Auch in diesem Bereich könnten mit Hilfe der VNTR-Typisierung epidemiologische Zusammenhänge (Migration, Ausbrüche beim Rind) besser aufgedeckt werden.

AKTUELLE ENTWICKLUNG IN DER DIAGNOSTIK

Die Überwachung der Rindertuberkulose im Rahmen der Fleischbeschau bedingte bislang, dass verdächtige Organveränderungen in bis zu acht Wochen dauernden, kulturellen Untersuchungen abgeklärt werden mussten. Um die post-mortale TB-Diagnostik zu beschleunigen, wurde im NRL Tuberkulose seit mehreren Jahren der molekulare Nachweis von Tuberkulose direkt aus verdächtigen Gewebeprobe durchgeföhrt. Als sensitives, robustes und wenig kontaminationsgeföhrtetes Verfahren für die Routinediagnostik an Untersuchungsämtern wurde in jüngster Zeit ein *real-time* PCR-System zum Nachweis von Erregern des MTC in Verdachtsproben von Rindern entwickelt. Aufgrund ihrer analytischen Sensitivität und Spezifität wurden für das PCR-System Primer-Sonden-Kombinationen für zwei Zielregionen innerhalb des MTC-Genoms [IS1081 und eine putative Helicase (HELI)] ausgewählt. In zwei Duplex-PCRs dient jeweils die Amplifizierung des β -Aktin-Gens als internes Kontrollsystem. Die analytische Sensitivität des Systems liegt bei 5 Fentogramm (10^{-15} Gramm) *M. bovis*-DNA. Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterienspezies traten nur vereinzelt bei der HELI-PCR auf. Zum Aufbau eines diagnostischen Systems wurde auch ein Verfahren zur DNA-Extraktion evaluiert. Für die Extraktion aus verändertem Gewebe erwiesen sich zwei säulenbasierte Kits unter Einbeziehung eines Einfrier-Auftau-Zyklus als am effektivsten und am wenigsten kontaminationsanfällig.

Die Ergebnisse der Untersuchung von Gewebeprobe mit Hilfe dieses diagnostischen Systems sind den Ergebnissen der kulturellen Anzucht in Tab. 1 gegenüber gestellt. Alle Gewebeprobe von TB-unverdächtigen Schlachtrindern wurden im PCR-System als negativ bewertet. Proben, die in der kulturellen Anzucht mittel bis stark positiv waren (Score 2 – 4), konnten mit dem PCR-System sicher als positiv erkannt werden. Von zehn Proben mit einem schwach positiven Kulturergebnis (Score 1) wurden jedoch nur vier

Probenstatus	Anzahl	Kultur	Ergebnis der PCR-Untersuchungen						
			PCR1 (HELI)		PCR2 (IS1081)		Beurteilung		
	n	Score	neg	pos	neg	pos	neg	pos	+/-
negativ	42	0	42	0	42	0	42	0	0
	1	Kont	1	0	1	0	1	0	0
positiv	10	1	6	4	6	4	6	4	0
	10	2	1	9	0	10	0	9	1
	8	2-3	0	8	0	8	0	8	0
	4	3-4	0	4	0	4	0	4	0
	8	Kont	4	4	4	4	4	4	0
	40		11	29	10	30	10	29	1

Erläuterungen: Kont +/- Kontamination fraglich

Tabelle 1: Vergleichende Untersuchung von Gewebeprobe natürlich infizierter oder TB-unverdächtiger Rinder im *real-time* PCR-System und mittels Kultur (DNA-Extraktion mit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) mit Einfrier-Auftau-Zyklus, 30 mg Gewebe)

mit beiden PCRs als positiv eingestuft. Andererseits konnten von acht Proben, bei denen aufgrund einer Überwucherung der Kulturen mit Begleitflora kein auswertbares Kulturergebnis erzielt wurde, vier mit dem PCR-System als positiv beurteilt werden.

Das PCR-System wurde im Rahmen eines Ringversuches in 15 Untersuchungsämtern getestet und erwies sich auch unter Routinebedingungen als spezifisch, sensitiv und robust. Es führt bei positivem Ergebnis zu einer deutlichen Verkürzung der Nachweiszeiten bei Verdachtsproben und kann dazu beitragen, dass Organveränderungen, die bei der Fleischschau auffallen, in Zukunft häufiger gemeldet und abgeklärt werden. Entsprechend wurde das PCR-System in der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes in der Fassung vom 17.06.09 als wichtigste direkte Nachweismethode für die postmortale TB-Diagnostik vorgesehen.

Zur Überwachung der Rindertuberkulose in den Beständen ist die Tuberkulinprobe nach wie vor das wesentliche Diagnostikverfahren. Neben der aufwendigen Durchführung führt aber auch die relativ subjektive Testauswertung zur schwindenden Akzeptanz dieses Tests. Aufgrund guter Erfahrungen aus Staaten mit hoher TB-Prävalenz wird in der Richtlinie 64/432/EG der Gamma-Interferon-Test als unterstützender Test (*ancillary test*) zur Tuberkulinprobe mit dem Ziel der Erhöhung der Sensitivität in TB-positiven Beständen empfohlen. Für Deutschland mit seiner niedrigen TB-Prävalenz, aber starken Verbreitung der Paratuberkulose in Rinderbeständen ist jedoch die Spezifität des Tests von herausragender Bedeutung. Daher wurde in einer Pilotstudie die Spezifität des einzigen derzeit kommerziell verfügbaren Gamma-Interferon-Tests (BOVIGAM mit den dort empfohlenen Antigenen) bei Paratuberkulose-infizierten Milchkühen untersucht (Tab. 2). Der Test wies bei TB-unverdächtigen, aber Paratuberkulose-positiven Rindern eine hohe Spezifität auf und ist zur Abklärung fraglicher Hauttest-Resultate in TB-Kontaktbeständen gut geeignet.

Gamma-Interferon-Test	TB-positive Bestände Einzeltiere		TB-unverdächtige Bestände Einzeltiere	
	Hauttest positiv (n = 11)	Hauttest fraglich (n = 7)	Paratuberkulose positiv* (n = 50)	Paratuberkulose unverdächtig (n = 10)
positiv	9	7	0	0
negativ	2	0	50	10

*Ausscheidung von *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* kulturell nachgewiesen

Tabelle 2: Untersuchung von Blutproben von Rindern aus TB-positiven und TB-unverdächtigen Beständen im Gamma-Interferon-Test (BOVIGAM, Fa. Prionics).

FORSCHUNGSBEDARF UND NEUE FORSCHUNGSANSÄTZE

Typischerweise leiden TB-infizierte Rinder lange bevor die Infektion klinisch apparent wird unter der Infektion und scheiden den Erreger in die Umwelt aus. In Ermangelung einfacher und sensitiver Methoden zur Detektion des Erregers oder gegen ihn gerichteter Antikörper basiert die *Intra-vitam*-Diagnostik derzeit vor allem auf dem Nachweis einer spezifischen T-Zell-Immunität. Die Tuberkulinprobe, im Prinzip ein *In-vivo*-T-Zell-Test, hat in den 50er und 60er Jahren des letzten Jahrhunderts maßgeblich zum Erfolg des TB-Bekämpfungsprogramms in Deutschland beigetragen. Mit der Entwicklung des Gamma-Interferon-Tests, bei dem die Aktivität TB-spezifischer T-Zellen im Blut durch Restimulation von Blutleukozyten *in vitro* bestimmt wird, steht inzwischen ein weiteres diagnostisches Verfahren zur Verfügung, das auf einem ähnlichen Nachweisprinzip beruht. In beiden Verfahren können nach vorhergehendem Kontakt der getesteten Rinder zu atypischen Mykobakterien fragliche oder falsch-positive Testergebnisse auftreten. Durch die unzureichende Spezifität der verfügbaren Nachweisverfahren am lebenden Tier wird die (Wieder-)Einführung eines intensiven TB-Monitorings in Ländern wie Deutschland mit aktuell niedriger Prävalenz der Rindertuberkulose erheblich erschwert. Vor diesem Hintergrund wird in einem integrierten, interdisziplinären Ansatz in Zusammenarbeit mit dem Paul-Ehrlich-Institut versucht, spezifischere Antigene zu identifizieren und diese, eingesetzt in neuartigen Verfahren zur Quantifizierung spezifischer T-Zellen des Rindes, für eine frühe Diagnostik und ein verbessertes Monitoring der Rindertuberkulose verfügbar zu machen.

FAZIT

Deutschland besitzt den Status „amtlich frei von Rindertuberkulose“, d. h. über 99,9 Prozent der Rinderbestände sind TB-frei. Allerdings ist die Rindertuberkulose in Deutschland nicht getilgt. Unter den seit der vorletzten Änderung der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes 1997 durchgeführten Überwachungsmaßnahmen könnte sich die Infektion wieder unerkannt ausgebreitet haben. Aufgrund der derzeit verfügbaren Informationen ist die wahre Prävalenz und Inzidenz der Rindertuberkulose in Deutschland nur ungenügend abschätzbar und die zukünftige Entwicklung der Seuchensituation nur schwer zu überwachen. Wegen der Unzulänglichkeiten der derzeitigen Verfahren zur Feststellung der Seuche am lebenden Tier besteht die dringende Notwendigkeit der Verbesserung der *Intra-vitam*- und der postmortalen Diagnostik der Rindertuberkulose.

LITERATUR

- ERLER, W., D. KAHLAU, G. MARTIN, L. NAUMANN, D. SCHIMMEL, AND A. WEBER. 2003. Zur Epizootiologie der Rindertuberkulose in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 116:288-292.
- FROTHINGHAM, R., AND W. A. MEEKER-O'CONNELL. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144:1189-96.
- KAMERBEEK, J., L. SCHOOLS, A. KOLK, M. VAN AGTERVELD, D. VAN SOOLINGEN, S. KUIJPER, A. BUNSCHOTEN, H. MOLHUIZEN, R. SHAW, M. GOYAL, AND J. VAN EMBDEN. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907-914.
- KUBICA, T., S. RÜSCH-GERDES, AND S. NIEMANN. 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 41:3070-3077.
- PRODINGER, W. M., A. BRANDSTÄTTER, L. NAUMANN, M. PACCIARINI, T. KUBICA, M. L. BOSCHIROLI, A. ARANAZ, G. NAGY, Z. CVETNIC, M. OCEPEK, A. SKRYPNYK, W. ERLER, S. NIEMANN, I. PAVLIK, AND I. MOSER. 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* 43:4984-4992.

Institut für Nutztiergenetik (ING)

MOLEKULARE UNTERSUCHUNGEN ZUR DIFFERENZIERUNG VON HAUSHUHNRASSEN

Weigend, S.

Von den landwirtschaftlich genutzten Geflügelarten sind Hühner die bedeutendsten und stellen eine wichtige Quelle der menschlichen Ernährung dar. Die Unterschiede in Größe, Körperform und Gefiederfarbe zwischen den zahlreichen Rassen und Lokalschlägen demonstrieren eindrucksvoll die Variationsbreite, die sich während der Domestikation innerhalb der Tierart Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) entwickelt hat. Das Rote Kammhuhn (*Gallus gallus*) hat fünf Unterarten und bildet den hauptsächlichen Ausgangspunkt aller unserer heutigen Haushühner. Neue Arbeiten deuten jedoch darauf hin, dass es zu Kreuzungen zwischen Gallus-Arten gekommen sein könnte und möglicherweise auch das Sonnerat Huhn (*Gallus sonneratii*) zur Entwicklung unserer Haushühner beigetragen hat (Nishibori *et al.*, 2005; Eriksson *et al.*, 2008). Ausgehend von den Domestikationszentren haben sich Hühner nach China, Persien und Ägypten ausgebreitet und gelangten im 7. Jahrhundert v. Chr. in Gebiete nördlich der Alpen. Erste Hinweise auf Hühner im Mittelmeerraum stammen aus dem 8.-6. Jahrhundert v. Chr. (Marks und Krebs, 1968; Wandelt und Wolters, 1996). Mit den Eroberungszügen der Römer erfolgte eine weitere Ausbreitung nach Nordeuropa. Obwohl im Mittelalter eine Neubelebung der Geflügelzucht stattfand, wurden durch den Dreißigjährigen Krieg große Teile der Geflügelbestände vernichtet, die erst in den 40er Jahren des 19. Jahrhunderts wieder anstiegen. Nach 1900 setzte eine nahezu vollständige Trennung zwischen der Wirtschafts- und Rassegeflügelzucht ein. Ein großer Teil der aus einer wirtschaftlichen Nutzung verdrängten Hühnerrassen hat Freunde in der Rassegeflügelzucht gefunden und wird bis heute von Hobbyzüchtern gepflegt. Es wurden erste Erhaltungszuchtprojekte lokaler Geflügelrassen in Deutschland gegründet (Abb. 1). Im Wirtschaftsgeflügelbereich waren in den letzten 100 Jahren die Veränderungen sowohl in der Züchtungsmethodik als auch in der Fütterung und Haltung der Tiere mit einer enormen Leistungssteigerung und Effizienzverbesserung verbunden. Dabei hat sich die Zuchtarbeit auf eine zunehmend geringer werdende Anzahl Unternehmen konzentriert, die hoch spezialisierte Linien der Mast- und Legerichtung entwickelt haben. Diese Zuchtprodukte haben schnell eine weite Verbreitung gefunden und leistungsschwächere Rassen wurden aus der Nutzung verdrängt. Während um 1900 noch etwa 40 Rassen allein in den Geflügelzuchtstationen Deutschlands registriert waren (Knispel, 1908), beschränken sich heutige Zuchtlinien weltweit auf wenige Ausgangsrassen (Crawford, 1990). Beispielsweise gehen alle wirtschaftlich genutzten

Hühner, deren Eier eine weiße Schalenfarbe haben, auf eine einzige Rasse zurück, die Rasse Weißes Leghorn. Obwohl bei Hühnern mit braunschaligen Eiern sowie bei Masttieren mehrere Rassen den Ausgangspool moderner Zuchtlinien bildeten, ist die Situation doch sehr ähnlich. Ein Aussterben von Rassen bedeutet einen Verlust an genetischer Vielfalt. Jedoch ist die Höhe des Verlustes abhängig davon, wie eng verwandt die Rasse mit anderen, noch existenten Rassen ist und wie viel Gemeinsamkeiten sie mit den wirtschaftlich genutzten Linien aufweist. Vor diesem Hintergrund haben in den letzten 15 bis 20 Jahren Methoden der Molekulargenetik zunehmend Anwendung zur Quantifizierung genetischer Unterschiede bei Hühnern wie bei allen landwirtschaftlichen Nutztieren gefunden.



Abb. 1: Vorwerkhühner aus dem Modellprojekt zur Erhaltung gefährdeter Geflügelrassen in Deutschland.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Variabilität in der DNA aussagekräftige Informationen über genetische Unterschiede zwischen Individuen, Familien und Populationen liefert. Die meisten Diversitätsstudien beim Huhn basierten auf 20 bis 30 molekularen Markern einer besonderen Art, den so genannten Mikrosatelliten. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um kurze DNA-Sequenzen (zwischen 1 und 5 Basenpaaren [bp]), die sich mehrfach hintereinander wiederholen (repetitive Sequenzen). Die Anzahl der Wiederholungen kann zwischen Individuen variieren. Mikrosatelliten können dabei einfache Repeatfolgen aufweisen, z. B. (GT)_n, oder sich aus unterschiedlichen Repeats zusammensetzen [z. B. (GTA)_n (AAT)_n]. Sie sind hochpolymorph, weisen einen hohen Grad an Heterozygotie auf, werden ko-dominant vererbt und sind über alle Chromosomen des Genoms verteilt. Sie lassen sich relativ einfach mittels PCR und Gel-Elektrophorese analysieren und haben daher eine weite Verbreitung gefunden.

Unter Verwendung von Mikrosatelliten wurden beim Haushuhn umfangreiche Untersuchungen im Rahmen des EU-Projektes AVIANDIV (Hillel *et al.*, 2003; Weigend *et al.*, 2004; AVIANDIV EU Vertragsnummer: BIO4-CT98-0342 (1998-2000); Weigend, S (Koordinator), M.A.M. Groenen, M. Tixier-Boichard, A. Vignal, J. Hillel, K. Wimmers, T. Burke, and A. Mäki-Tanila <http://w3.tzv.fal.de/aviandiv/index.html>;) und in Anschlussprojekten durchgeführt. Die in diese Untersuchungen einbezogenen Populationen umfassten zahlreiche lokale Hühnerrassen Europas, Asiens und Afrikas (Tabelle 1). Als Referenz wurden außerdem Linien aus der Wirtschaftsgeflügelzucht (Legelinien mit weißer und brauner Eischalenfarbe, Mastrichtung) sowie zwei Unterarten des Roten Kammmuhns (*G. g. gallus* und *G. g. spadiceus*) einbezogen. Eine erste Information über die genetische Variabilität innerhalb einer Population liefert der durchschnittliche Grad der Heterozygotie in den analysierten Genorten. Der beobachtete Heterozygotiegrad kann direkt durch Zählung heterozygoter Tiere relativ zur Gesamtzahl untersuchter Tiere ermittelt werden. Der unter der Annahme, dass sich die Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet, erwartete Heterozygotiegrad einer Population lässt sich aus den Allelfrequenzen der einzelnen Loci für die jeweilige Population schätzen. In Abbildung 2 ist der erwartete (X-Achse) und der beobachtete (Y-Achse) mittlere Heterozygotiegrad von 85 Hühnerpopulationen aufgetragen. Die Linie zeigt den Wert an, wenn der erwartete Heterozygotiegrad gleich dem beobachteten wäre. Bei den meisten Populationen ist ein etwas geringerer Heterozygotiegrad zu finden als erwartet, was auf ein geringes Maß an Inzucht innerhalb der Populationen hinweist. Die Wildhuhnpopulationen weisen einen hohen Grad an Heterozygotie auf, während er zwischen den lokalen Rassen Europas erheblich variiert und insgesamt geringer als bei den untersuchten Populationen aus Asien und Afrika ist. Interessant ist der Vergleich zwischen den Linien der Wirtschaftsgeflügelzucht. Zuchtli-

nien der Mastrichtung (Broiler) sind offensichtlich variabler als die der Leger. Jedoch lassen sich auch zwischen den Legelinien deutliche Unterschiede erkennen. Die Linien der weißschaligen Legerichtung rangieren am unteren Ende der Skala, während Braunlegerlinien einen mittleren Bereich einnehmen. In der Vergangenheit wurden immer wieder Bedenken geäußert, dass die genetische Variabilität insbesondere in den Zuchtlinien der weißen Legerichtung erheblich eingeschränkt sei, da diese Linien von einer begrenzten Anzahl Tiere einer einzigen Rasse abstammen (Weißes Leghorn) und seit Generationen einer intensiven Selektion ausgesetzt sind. Obwohl die Ergebnisse diese Annahme bei den Weißlegern unterstützen, spiegeln alle Linien der Wirtschaftsgeflügelzucht zusammen jedoch eine beachtliche Variabilität wider. Unterschiede im Polymorphiegrad zwischen Populationen in Abhängigkeit von der Populationsgeschichte und dem Management wurden auch in anderen Studien gefunden (Granevitze *et al.*, 2007).

Wildpopulationen		Europa	
- <i>G.g. gallus</i>	2	- Deutschland	27
- <i>G.g. spadiceus</i>	1	- Ungarn	11
		- 7 andere Länder	8
Kommerzielle Linien		Asien	
- Weißleger	2	- China	14
- Braunleger	3	- Vietnam	1
- Masthuhn	4	- Israel	1
Experimentelle Linien		Afrika	
- Weißleger	2	- Simbabwe	5
- Braunleger	2	- Malawi	1
		- Sudan	1

Tabelle 1: Hühnerpopulationen, die in molekulargenetische Untersuchungen einbezogen wurden.

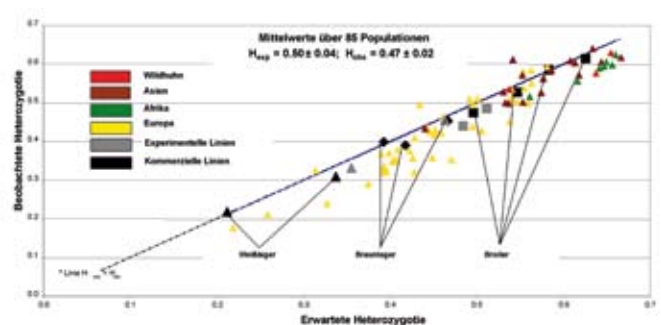


Abb. 2: Beobachteter (H_{obs}) und erwarteter Heterozygotiegrad (H_{exp}) von 85 Hühnerpopulationen basierend auf der Analyse von 29 Mikrosatelliten.

In einer Modellstudie wurde im Rahmen des AVIANDIV Projektes die Nutzbarkeit von Typisierungen mit Mikrosatelliten für die richtige Zuordnung von Individuen zu den jeweiligen Rassen demonstriert. Unter der Annahme, dass genetisch wenig verwandte Rassen oder Gruppen von Rassen unter-

schiedliche genetische Eigenschaften tragen, hat eine systematische Gruppierung von Rassen Bedeutung für weitere Studien zur Identifizierung funktioneller Unterschiede. Der verwendete Algorithmus, der in das Programmpaket STRUCTURE implementiert ist (Pritchard *et al.*, 2000), erlaubt eine Gruppierung von Individuen anhand ihrer Genotypinformationen der analysierten Mikrosatelliten und ist unabhängig von Annahmen, zu welcher Population ein Individuum gehört. Unter Verwendung dieser Methode konnte von Eding und Weigend (2008) gezeigt werden, dass sich ein Pool von Hühnerpopulationen aus verschiedenen Kontinenten und mit unterschiedlicher Entwicklungsgeschichte in drei große Gruppen unterteilen lässt (Abb. 3). Eine vierte Gruppe fasst Populationen zusammen, die keiner der anderen drei Gruppen eindeutig zugeordnet werden können. Auffällig ist, dass die Cluster 1 bis 3 vorrangig geographisch getrennte Populationen enthalten. Im Cluster 1 sind vor allem lokale Populationen aus Asien (China und Vietnam) sowie Wildhühner zu finden. Zwei Rassen jedoch, Cochin und Brahma, die aus Hobbyzuchten in Deutschland stammen, fallen ebenfalls in diese Gruppe. Die Eingruppierung korrespondiert mit ihrer genetischen Abstammung. Das zweite Cluster wird dominiert von afrikanischen Hühnern aus Simbabwe und Malawi sowie Hühnerpopulationen aus Ungarn. In diesem Cluster findet man auch Zuchtlinien der Mastriichtung und der Braunleger. Das dritte Cluster vereint insbesondere lokale Hühnerrassen Mittel- und Nordeuropas. Interessanterweise finden wir in dieser Gruppe auch eine Population aus dem Sudan und eine andere aus Israel. In dieses Cluster fallen ebenfalls Zuchtlinien der Weißleger, die ihren Ursprung in den Weißen Leghorn haben, einer Rasse, die auf ein italienisches Landhuhn zurückgeht.

Wie auch bei anderen Nutztierarten wurden beim Huhn Polymorphismen in der mitochondrialen (mt)DNA für phylogenetische Studien genutzt. Die mtDNA ist ein ringförmiges Molekül, das beim Huhn eine Größe von 16.775 bp hat

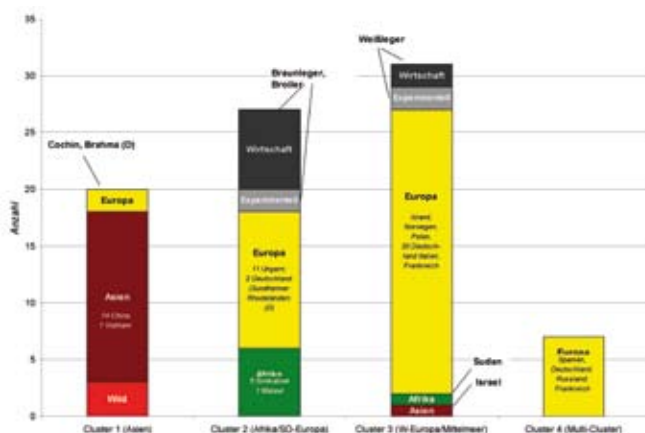


Abb. 3: Gruppierung von 85 Hühnerpopulationen anhand von 29 Mikrosatelliten basierend auf einer Analyse der Populationsstruktur.

(Desjardins und Morais, 1990). Eine Region der mtDNA, die so genannte „displacement loop“ (D-loop) Region, enthält Elemente, die die Replikation des DNA-Moleküls kontrollieren. Die D-Loop-Region ist für phylogeographische Studien besonders geeignet, da sie hochpolymorph ist. Sie enthält keine kodierenden Bereiche für Gene und weist gegenüber nukleärer DNA eine wesentlich höhere Mutationsrate auf. Akishinomiya *et al.* (1994, 1996) untersuchte die D-loop Region von verschiedenen *Gallus*-Arten einschließlich dem Roten Kammhuhn (*Gallus gallus*) und einiger domestizierter Rassen. Zusammen mit Ergebnissen von Niu *et al.* (2002) sprechen diese Daten für eine monophyletische Abstammung unserer Haushühner vom Roten Kammhuhn in Thailand. Diese Sichtweise ist jedoch - wie bereits erwähnt - durch neuere Arbeiten in Frage gestellt. Innerhalb der Art *Gallus gallus* wurde von Liu *et al.* (2006) und Oka *et al.* (2007) gezeigt, dass verschiedene Wildhühnerpopulationen aus unterschiedlichen Regionen an den Haushühnern beteiligt waren. Das unterstützt die Theorie, dass es beim Haushuhn wie auch bei anderen Nutztierarten mehrfache Domestikationsereignisse gegeben hat, wahrscheinlich in Südostasien und Indien. Muchadeyi *et al.* (2008) untersuchten Sequenzpolymorphismen in D-loop der mtDNA bei afrikanischen Hühnern aus Simbabwe, Malawi und Sudan im Vergleich zu einigen Zuchtlinien aus der Wirtschaftsgeflügelzucht (Braun- und Weißleger, Broiler). Eine Netzwerk-Analyse (Abb. 4) zeigt die Existenz von drei großen Gruppen (maternale Linien). In einer dieser Gruppen waren sowohl afrikanische Hühner als auch Tiere der kommerziellen Zuchtlinien zu finden (Clade C), während in einer zweiten Gruppe (Clade A) nur Hühner aus Simbabwe und Malawi auftraten. Ein Abgleich mit DNA-Sequenzen aus der Genbank lässt vermuten, dass der Ursprung der maternalen Linie C (Clade C) in Indien

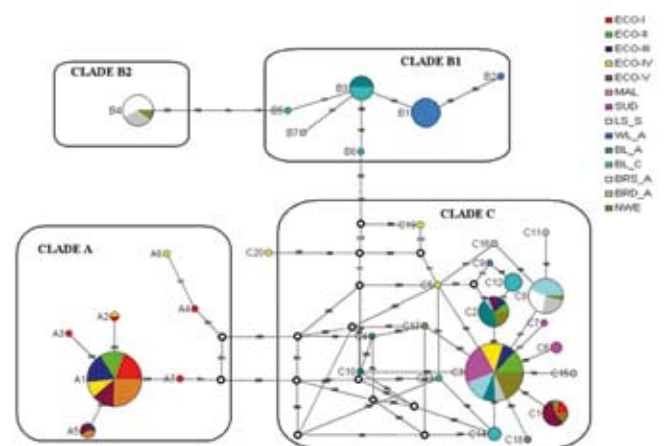


Abb. 4: Netzwerk basierend auf mtDNA D-loop Haplotypen bei Hühnern aus Simbabwe (ECO-I - V), Malawi (MAL) und dem Sudan (SUD) und einigen Rassen aus Europa (NWE) sowie Zuchtlinien aus der Wirtschaftsgeflügelzucht (WL_A, LS_S [Weißleger]; BL_A, BL_C [Braunleger]; BRS_A, BRD_A [Broiler]). Die Größe der Kreise entspricht der Haplotypenfrequenz.

zu suchen ist, der der maternalen Linie A in Südostasien. Die maternale Linie B trat bei den Hühnern in Simbabwe und Malawi nicht auf und weist auf einen anderen Ursprung hin.

Molekulare Methoden stellen unentbehrliche Werkzeuge zur Charakterisierung und letztendlich zur Erhaltung und zum Schutz genetischer Diversität bei landwirtschaftlichen Nutztieren dar. Der Kenntniszuwachs und die damit verbundenen technologischen Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekulargenetik in den letzten Jahren sind rasant. Während beispielsweise die Entschlüsselung der DNA-Sequenz des Menschen noch viele Jahre in Anspruch genommen hat, stehen heute Technologien zur Verfügung, mit denen ganze Genome innerhalb relativ kurzer Zeit analysiert werden können. Im Dezember 2004 wurde in der Zeitschrift „Nature“ über die Ergebnisse der Sequenzierung des Gesamtgenoms des Huhnes berichtet (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004). Gegenwärtig sind mehr als drei Millionen Einzelpunktmutationen (SNPs) beim Huhn in Genbanken registriert (NCBI/SNP-Datenbank, Stichwort „Chicken“; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Im AVIANDIV Projekt wurden durch Sequenzierung verschiedener Bereiche im Hühnergenom in zehn diversen Rassen eine Dichte von einem SNP pro 50 bp identifiziert (Schmid *et al.*, 2005), die deutlich höher war als die, die in dem genomweiten Sequenzierungsprojekt berichtet wurde (1 SNP je 200 Basenpaare). Die Ursache ist in der Analyse phylogenetisch distanter Populationen zu sehen. Neueste Studien scheinen die Existenz einer weit höheren Anzahl polymorpher Stellen im Hühnergenom als ursprünglich berichtet zu bestätigen. SNP Daten sind in Datenbanken öffentlich zugänglich und liefern die Grundlage für die Erstellung sogenannter SNP-Chips, auf denen 50.000 SNPs (die in unterschiedlichen Bereichen im Genom lokalisiert sein können) oder mehr pro Individuum gleichzeitig analysiert werden können. Im Rahmen des Agro-Innovationsclusters „Synbreed – Synergistische Pflanzen- und Tierzucht“ (<http://www.synbreed.tum.de/>, Gesamtkoordination Technische Universität München) werden diese neuen Technologien der molekularen Analyse u. a. zur weiteren Erforschung genetischer Diversität im Teilprojekt R2 „Entwicklung eines SNP Diversitätspanel beim Huhn“ genutzt, bei dem das Institut für Nutztiergenetik des FLI in enger Kooperation mit der Georg-August-Universität Göttingen federführend beteiligt ist. Dabei sollen Methoden weiterentwickelt werden, um anhand von SNP-Profilen für eine bestimmte Rasse oder Population den Grad ihrer genetischen Einmaligkeit zu quantifizieren. Dichte SNP Karten ermöglichen es auch, Genombereiche zu identifizieren, die durch Selektion beeinflusst werden (Selektionssignaturen). Es ist anzunehmen, dass sich die Möglichkeiten der Genomanalyse in naher Zukunft stürmisch weiterentwickeln werden, so dass statt der Analyse diskreter Bereiche des Genoms (einzelne SNPs) in Zukunft die Komplettssequenz der Individuen zur Verfügung stehen wird.

LITERATUR

- HILLEL, J., M.A. GROENEN, M. TIXIER-BOICHARD, A.B. KOROL, L. DAVID, V.M. KIRZHNER, T. BURKE, A. BARRE-DIRIE, R.P. CROOIJMANS, K. ELO, M.W. FELDMAN, P.J. FREIDLIN, A. MÄKI-TANILA, M. OORTWIJN, P. THOMSON, A. VIGNAL, K. WIMMERS, AND S. WEIGEND. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet Select Evol* 35:533-557.
- WEIGEND, S., M.N. ROMANOV, G. BEN-ARI, AND J. HILLEL. 2004. Overview on the use of molecular markers to characterise genetic diversity in chickens. In: *World's Poult. Congr. Exhibition, Participant List and Full Text CD*, Istanbul, Turkey.
- GRANEVITZE, Z., J. HILLEL, G.H. CHEN, N.T.K. CUC, M. FELDMAN, H. EDING, AND S. WEIGEND. 2007. Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. *Anim Genet* 38:576-583.
- EDING, H., AND S. WEIGEND. 2008. Benchmark and sequential safe set analysis of genetic diversity in 85 chicken populations. In: *Proc. 23rd. World's Poultry Congress*, Brisbane, Australien.
- MUCHADEYI, F.C, H. EDING, H. SIMIANER, C.B.A. WOLLNY, E. GROENEVELD, AND S. WEIGEND. 2008. Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. *Anim Genet* 39:615-622.

Weitere Literatur kann beim Verfasser angefordert werden.

Institut für Immunologie (IfI)

MRNA-BASIERTE IMMUNPROPHYLAXE GEGEN INFLUENZAVIRUSINFEKTIONEN

Petsch, B.¹, Schnee, M.², Zirdum, E. 1, Neumann, K.², Kallen, K.-J.², Kramps, T.², Stitz, L.¹

¹Institut für Immunologie, ²CureVac GmbH

Voltaire beschreibt in einem Brief des Jahres 1733 einen Brauch der Tscherkessen, bei dem sie zum Schutz der Schönheit ihrer Töchter, die für die Harems der damaligen Zeit vorgesehen waren, diese im Kindesalter mit Pustelmaterial der „allergewöhnlichsten und zugleich schönst entwickelten Pocken“ impften. Tatsächlich übten die Chinesen bereits seit dem 15. Jahrhundert den Brauch, getrockneten und pulverisierten Schorf von Pocken „durch die Nase zu schnupfen genauso wie wir Schnupftabak zu uns nehmen“, bevor durch die bahnbrechenden wissenschaftlichen Beobachtungen von Edward Jenner 1798 die Methode der Vakzinierung eingeführt wurde. Heute können gegen eine Vielzahl von viralen Erregern sowie gegen Bakterien bzw. deren Toxine protektive Immunisierungen durchgeführt werden, die bei einigen Infektionen sogar offensichtlich zur weltweiten Eradikation der betreffenden Erreger (z. B. Pocken) geführt hat.

Auch Schutzimpfungen gegen das Influenzavirus werden seit Jahrzehnten durchgeführt. Hierbei sind verschiedene Vakzine zum Einsatz gekommen; die *traditionellen Vakzine* basieren auf kompletten Viruspartikeln, die inaktiviert oder attenuiert werden. Bei diesen Vakzinen bestehen grundsätzlich Sicherheitsprobleme, die z. B. auf nicht ausreichende Inaktivierung oder Attenuierung, Wiedergewinnung der Virulenz aufgrund von Mutationen und Instabilität zurückzuführen sind. Eine Immunisierung von immunkompromitierten Impflingen oder Schwangeren bzw. trächtigen Tieren ist nicht angeraten.

Die so genannte *Subunit-Vakzine* sind Viruspräparationen, die nach entsprechender Behandlung von Viruspartikeln virale Bestandteile, jedoch keine virale Nucleinsäure mehr aufweisen. Durch die Identifizierung der entscheidenden antigenen Strukturen der viralen Antigene können hochgereinigte Subunit-Vakzine hergestellt werden.

Diese Identifizierung der immunogenen Bestandteile von Viren haben dann auch zur Entwicklung synthetischer Vakzine geführt, bei denen *synthetisierte Peptide* verwendet werden, die die entscheidenden Muster für die Induktion einer spezifischen Immunantwort enthalten. Solche synthetischen Vakzine besitzen den großen Vorteil, dass sie jeweils an Veränderungen der Krankheitserreger schnell angepasst werden können, allerdings stimulieren sie keine gute T-Zellantwort und sind nicht geeignet für antigene Komponenten, die in komplizierteren Konformationen vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit zur Immunisierung gegen Krankheitserreger stellen die so genannten *rekombinanten Impfstoffe* dar, bei denen in Bakterien, Hefen, Säugerzellen oder mit Hilfe von rekombinanten Viren die gewünschten, für die Impfung notwendigen Proteine hergestellt werden. Insbesondere auf viralen Vektoren basierte Vakzine haben sich als effektiv erwiesen, da durch diese Vektoren *in vivo* ausreichend Antigen hergestellt wird, das eine humorale und zelluläre Immunantwort induzieren kann. Schließlich sind *DNA-Vakzine* zu erwähnen, bei denen die für immunprotektive Proteine kodierende DNA direkt intramuskulär injiziert wird und dort die entsprechenden Fremdproteine exprimiert werden. Allerdings wurde der ursprüngliche Enthusiasmus für diese Immunisierungsmethode dadurch gedämpft, dass die Verabreichung meist nur mittels einer „Gene Gun“ gelingt, das Eindringen der DNA in Zellen beschränkt ist und die DNA grundsätzlich in das Zellgenom integriert werden könnte.

Mit Hilfe einer neuen Vakzinierungsstrategie, der Verwendung von messenger RNA (mRNA) zur Immunisierung, können diese Nachteile der DNA Vakzinierung vermieden werden. Die Verwendung von mRNA hat den großen Vorteil, dass die Translation der Proteine direkt im Zytoplasma ablaufen kann und somit die bei Verwendung von DNA notwendige Kernphase entfällt, in der zunächst mRNA transkribiert werden müsste, um dann erst im Zytoplasma translatiert werden zu können. Weiterhin ist eine Integration von mRNA ins Zellgenom nicht möglich, die bei DNA Vakzinierung zu einer Anschaltung von Onkogenen bzw. zur Abschaltung von Tumorsuppressorgenen führen könnte. Für die Verwendung von mRNA als Impfstoff ist allerdings eine Stabilisierung dieser ansonsten sehr empfindlichen Nucleinsäure notwendig, die durch ein von der Firma CureVac entwickeltes Verfahren erreicht werden kann. Für die Herstellung einer solchen RNActive® mRNA ist es lediglich notwendig, das Zielgen entsprechend zu modifizieren und die mRNA zu formulieren, im Falle von Vakzinen z. B. mit Protamin (Abb. 1). Die Tatsache, dass bei dieser Form der Immunisierung nur Nucleinsäure Verwendung findet, kürzt die Prozedur für die Herstellung der Vakzine erheblich ab. Es ist lediglich notwendig, die Charakterisierung und Sequenzierung eines krankheitsverursachenden Virus durchzuführen, wie sie bei jedem Seuchenverdacht ohnehin durchgeführt wird. Anschließend wird aufgrund der Sequenz von Nucleinsäureabschnitten, von denen bekannt ist, dass deren Translationsprodukte für die Induktion einer protektiven Immunantwort wichtig sind, eine DNA synthetisiert, die wiederum als

Matrize für die zur Immunisierung zu verwendenden mRNA dient. Somit ist es möglich innerhalb sehr kurzer Zeit einen Impfstoff zur Verfügung zu stellen. Bei der bisher üblichen Methode zur Vermehrung von Influenzaviren in Bruteiern oder auch in der Gewebekultur sind die Produktionszeiten erheblich länger, weil Wachstumseigenschaften der Viren *in vitro* sehr unterschiedlich sein können und eine ausreichende Produktion vor allem von der Anzahl neu gebildeter Viruspartikel abhängig ist. Dies führt dazu, dass für die Herstellung von Impfstoffen wie z. B. für die saisonale Grippe eine Zeitdauer von rund sechs Monaten einkalkuliert werden muss, bevor ein Impfstoff Verwendung finden kann. Für einen mRNA-Impfstoff wurden im Rahmen der Untersuchungen Szenarien durchgespielt, die bereits rund sechs bis acht Wochen nach Erhalt von Virussequenzen zu einer anwendungsfähigen Vakzine führten.

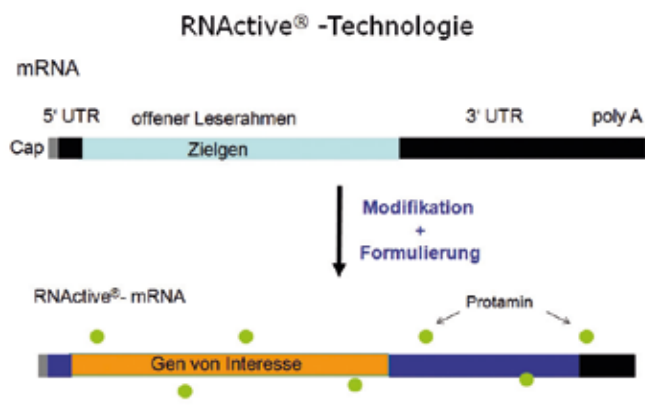


Abb. 1: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise der Herstellung einer RNActive mRNA.

Die Erreichung eines Schutzes gegen Influenzaviren gestaltet sich aufgrund von Eigenschaften dieses Virus in der Regel sehr schwierig, was im Wesentlichen auf Veränderungen im viralen Protein Hämagglutinin (HA) beruht, das die virale Komponente darstellt, gegen die virusneutralisierende Antikörper gerichtet sind. Durch antigene Drift und Shift können sich Hämagglutinine in ihrer Aminosäuresequenz ändern, sodass solche veränderten Viren nicht mehr von präformierten Antikörpern neutralisiert werden können. Diese Änderungen der antigenen Eigenschaften sind auch dafür verantwortlich, dass generell gegen jedes neu auftretende Influenzavirus neue Impfstoffe hergestellt werden müssen, was dazu führt, dass in der Regel die Zusammensetzung eines Influenzaimpfstoffes jährlich angepasst werden muss. Neben neutralisierenden HA-spezifischen Antikörpern werden auch solche gegen die Neuraminidase induziert, die allerdings nicht virusneutralisierend wirken, wohl aber die Viruslast während einer Infektion reduzieren können. Schließlich wird eine antivirale T-Zellantwort gegen konservierte innere Virusproteine wie NP, M1 und PB2 gerichtet, die

von MHC-Klasse I-restringierten CD8+ cytotoxischen T-Zellen getragen wird. Die auftretenden veränderten antigenen Eigenschaften eines Influenzavirus fordern also eine schnell adaptierbare Vakzinierungsstrategie, deren Umsetzung mit Hilfe von mRNA-Immunisierungen untersucht wurde. Zunächst wurde in einem homologen Influenzavirussystem mit einem H1N1 Virus A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) überprüft, ob eine Immunisierung mit HA-spezifischer mRNA eine antivirale Immunantwort induzieren kann. Zu diesem Zwecke wurden BALB/c Mäuse mit 80 Mikrogramm HA-spezifischer mRNA intradermal immunisiert, nach drei Wochen erhielten die Tiere eine Booster-Injektion mit der gleichen Dosis. Bei der Analyse im Hämagglutinationsinhibitions-Test (HAI) ergaben sich HAI-Titer von über 1:32, während sich bei Immunisierung mit inaktiviertem PR8 Virus höhere Titer von mehr als 1:256 ergaben. Bei Durchführung einer Belastungsinfektion mit der zehnfachen mittleren letalen Dosis (10 LD50) zeigte sich jedoch, dass, ebenso wie bei Immunisierung mit inaktiviertem Virus, alle mit mRNA immunisierten Tiere vor den Folgen einer Infektion geschützt waren (Abb. 2). Somit kann durch eine Grundimmunisierung mit anschließender Boosterinjektion durch HA-spezifische mRNA ein hundertprozentiger Schutz gegen das homologe Virus erreicht werden.

Überlebenskurve nach einer Infektion mit PR8 (10*LD50)

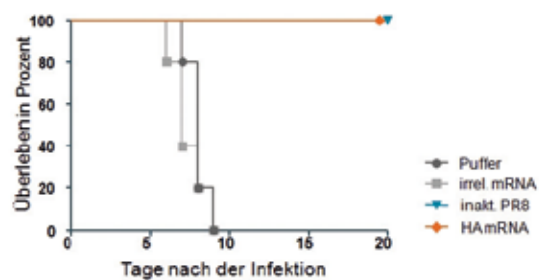


Abb. 2: Durch eine zweimalige Immunisierung mit einer das Hämagglutinin kodierenden mRNA sind hundert Prozent der immunisierten Mäuse vor einer homologen Influenzainfektion geschützt.

Da für die praktische Anwendung eines Impfstoffes eine einmalige Injektion für die Erreichung eines Schutzes angestrebt wird, wurden im gleichen homologen System weitere Untersuchungen durchgeführt. In diese Experimente wurde auch die Neuraminidase (NA) als weiteres virales Oberflächenglykoprotein mit eingeschlossen, da eine Immunisierung mit Neuraminidase, wie oben erwähnt, ebenfalls eine protektive Wirkung haben kann. Nach einmaliger Immunisierung mit HA-spezifischer oder NA-spezifischer mRNA von A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) fünf Wochen vor der Belastungsinfektion mit 10 LD50 kann bei Verwendung der HA-mRNA sowie bei Kombination von HA- und NA-spezifischer RNA ein hundertprozentiger Schutz erreicht werden (Abb. 3). Als Kontrolle diente wiederum die bereits erfolgreich getestete

zweimalige Verabreichung der HA-spezifischen mRNA (Abb. 3. HA P/B). Eine alleinige Gabe von NA-spezifischer mRNA kann hingegen nur weniger als die Hälfte der Tiere (40 Prozent) vor der Infektion schützen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass bereits eine einmalige Vakzinierung vor den Folgen einer Influenzavirusinfektion schützen kann, war es von großem Interesse zu untersuchen, ob die Effizienz der mRNA-Vakzine bei einmaliger oder mehrmaliger Immunisierung vergleichbar ist. Zu diesem Zwecke wurden die immunisierten und infizierten Mäuse täglich gewogen und die klinische Symptomatik beurteilt. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, weisen diese Tiere ein durchaus unterschiedliches Muster bei den Körpergewichten auf. Diese Gewichtskurven zeigen, dass mRNA-HA P/B sowie mRNA-HA plus mRNA-NA immunisierte Tiere ein konstantes Körpergewicht nach der Belastungsinfektion aufweisen (Abb. 4) und auch keine klinischen Symptome nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Hingegen weisen die einmalig mit HA-mRNA immunisierten Mäuse einen transienten Gewichtsverlust (Abb. 4) sowie leichte klinische Symptomatik auf. Allerdings wird die Virusinfektion auch in diesen Tieren so gut kontrolliert, dass sich alle Mäuse erholen und schließlich ihr Ausgangsgewicht wieder erreichen.

Einmalige Gabe der Virusprotein-kodierenden mRNAs

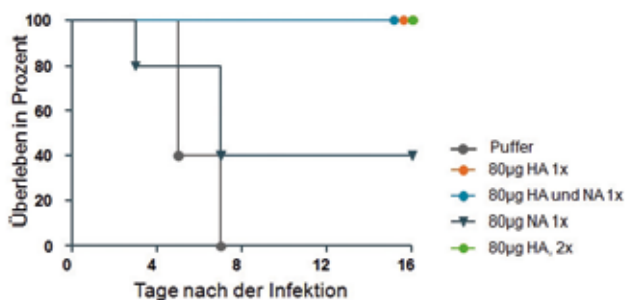


Abb. 3:

Eine einmalige Gabe von Hämagglutinin- oder der Kombination aus Hämagglutinin- und Neuraminidase-kodierender mRNA sichert allen immunisierten Mäusen das Überleben.

Einmalige Gabe der Virusprotein-kodierenden mRNAs

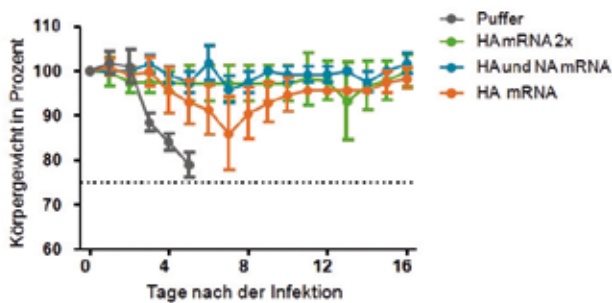


Abb. 4:

Die mit der Kombination von Hämagglutinin- und Neuraminidase-kodierender mRNA immunisierten Mäuse (Abb. 3) zeigen bei einmaliger Immunisierung nur leichte Schwankungen im Gewichtsverlauf.

Zum Nachweis der Dauer eines anhaltenden Schutzes vor Infektion nach mRNA-Immunisierung wurden Mäuse zweimal mit HA-spezifischer mRNA immunisiert und 16 Monate danach einer Belastungsinfektion mit A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) unterzogen. Während alle 16 Monate zuvor mit HA-mRNA immunisierten Tiere die Infektion überlebten, waren die experimentellen Gruppen von Tieren, die mit irrelevanter mRNA oder nur mit einer Pufferlösung behandelt worden waren, nicht vor der Infektion geschützt (Abb. 5).

Langanhaltender Impfschutz nach mRNA Immunisierung

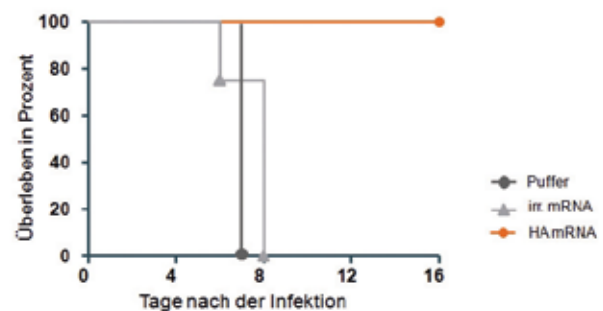


Abb. 5:

Mäuse, die zweimalig mit einer Hämagglutinin-kodierenden mRNA immunisiert wurden, sind auch 16 Monate nach der Immunisierung vor der Influenzainfektion geschützt.

Nachdem es gelungen war, die Effizienz einer mRNA-Immunisierung mit dem H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) zu zeigen, sollten diese Befunde auf andere Influenza A Viren übertragen werden, insbesondere auf solche Serotypen, die in der Vergangenheit bei Mensch und/oder Tier schwere Infektionsformen hervorgerufen hatten bzw. zur Ausrufung des Pandemiestatus durch die WHO geführt hatten. Deshalb wurden Experimente mit einem H5N1 Virus (Vogelgrippe) und dem rezenten H1N1 Virus (sog. Schweinegrippe; H1N1v) durchgeführt.

Zunächst wurde wiederum mRNA für das HA des H5N1 Virus A/Mallard/Bavaria/1/2006 (H5N1 MB1) hergestellt und zur Vakzinierung verwendet. Wie in Abbildung 6 zu sehen, sind nach einer Belastungsinfektion (10-fache LD50) mit diesem Virus nach vorhergehender HA-mRNA-Immunisierung sämtliche Mäuse geschützt, während alle Kontrolltiere zwischen Tag 7 und Tag 9 aufgrund spezifischer Atemwegsymptomatik und ihres schlechten Allgemeinzustandes getötet werden mussten. Somit konnte die gute Schutzwirkung der HA-mRNA, die für das H1N1 PR8 Virus gefunden wurde, ebenfalls für das hochpathogene H5N1 MB1 Virus gezeigt werden. Im gleichen Belastungsinfektionsmodell (H5N1 MB1) wurde auch untersucht, ob nach Immunisierung mit mRNA von konservierten Antigenen eines nicht-verwandten Influenzavirus ein heterologer Schutz erreicht werden kann. Hierfür wurden Mäuse mit der mRNA für NP und M2 des H1N1 Influenzavirus A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) nach

der Grundimmunisierung ein- oder zweimal einer Boosterinjektion unterzogen und eine bzw. vier Wochen nach der letzten Impfung mit dem H5N1 MB1 infiziert. Als Kontrolle diente wiederum die oben dargestellte Immunisierung und Belastungsinfektion im homologen Modell (HA-spezifische mRNA sowie Infektion mit H5N1 A/Mallard/Bavaria/1/2006), nach der alle Tiere überlebten. Wurden die Tiere nach Grundimmunisierung zweimal einer Boosterinjektion mit NP- und M2 mRNA von H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) unterzogen, so überlebten alle Tiere die Belastungsinfektion mit dem heterologen H5N1 A/Mallard/Bavaria/1/2006 Virus. Nach Grundimmunisierung und nur einer Boosterinjektion war der Effekt geringfügig schlechter, da nur noch 80 Prozent der vakzinierten Mäuse geschützt waren (Abb. 7).

Immunisierung mit Hämagglutinin kodierender mRNA (H5N1)

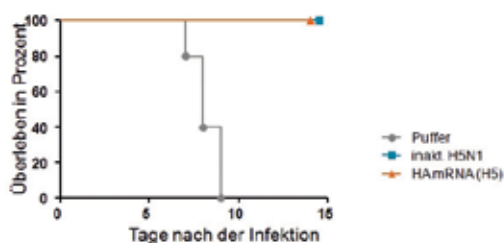


Abb. 6: Der Impfschutz durch die Hämagglutinin-kodierende mRNA kann auch auf ein hochpathogenes Influenzavirus vom Stamm H5N1 übertragen werden.

Heterologer Schutz nach Immunisierung mit NP und M2 von PR8 (H1N1)

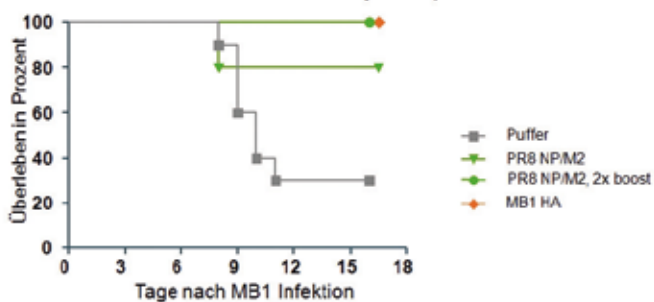


Abb. 7: Durch eine bis zu dreimalige Immunisierung mit den konservierten Antigenen NP und M2 des PR8 Virus kann ein Schutz vor einer heterologen H5N1-Infektion erreicht werden.

Letztendlich wurde unter Verwendung des kürzlich aufgetretenen Virus der Neuen Influenza (H1N1 A/Regensburg/D6/09; so genannte „Schweinegrippe“) sowohl die Möglichkeit der schnellen Herstellung einer mRNA-Vakzine als auch deren Schutzwirkung überprüft. Unmittelbar nach Publikation der HA-Sequenz dieses neuen Influenzavirus wurde mit der eingangs angeführten RActive® Technologie zur Produktion einer Neuen Influenza Vakzine begonnen und bereits wenige Wochen später standen größere Menge einer

Immunisierung mit HA-kodierender mRNA der Neuen Influenza (A/H1N1/09)

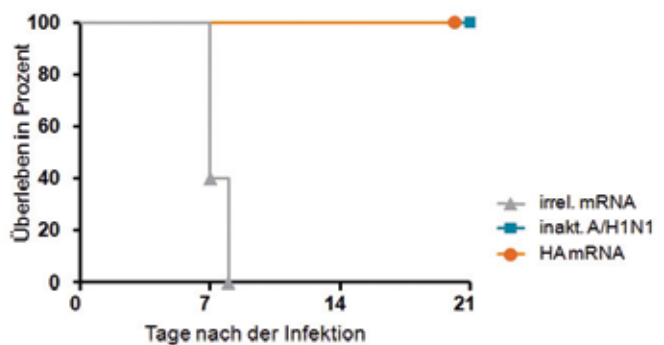


Abb. 8: Die Immunisierung mit einer Hämagglutinin-kodierenden mRNA vermittelt auch im Fall der neuen Influenza (H1N1/09) einen kompletten Schutz vor einer letalen Influenzainfektion.

HA-spezifischen mRNA-Vakzine zur Verfügung. Mäuse wurden mit dieser mRNA grundimmunisiert sowie einer Boosterinjektion unterzogen, bevor sie mit H1N1 A/Regensburg/D6/09 infiziert wurden. Die Überlebensrate der vakzinierten Tiere betrug wiederum 100 Prozent, während alle nicht-vakzinierten Mäuse aufgrund schwerer klinischer Symptomatik an den Tagen 7 und 8 getötet werden mussten (Abb. 8).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die neuartige Immunisierung mit mRNA vor einer Influenzavirusinfektion schützen kann. Bislang wurde stabilisierte immunstimulierende mRNA zur Immunisierung gegen Tumore verwendet, wobei gezeigt werden konnte, dass sowohl eine T-Zell- als auch eine B-Zell-Antwort generiert werden kann. Inzwischen liegen für das Tumormodell bereits erste Ergebnisse einer Phase I/II Studie im Menschen vor, die die Sicherheit einer mRNA-Immunisierung zeigen. Mit den hier dargestellten Ergebnissen wird die mRNA-Immunisierung erstmals erfolgreich für den Schutz vor einer viralen Infektionskrankheit eingesetzt. Diese neue erfolgreiche Strategie zur Vakzinierung eröffnet die Chance, dass mRNA Immunisierungen einen effektiven Schutz gegen Infektionskrankheiten vermitteln können.

Institut für Epidemiologie (IfE)

TSN 3.0 – DAS NEUE MELDE- UND KRISENMANAGEMENTSYSTEM FÜR DEUTSCHLAND

Probst, C., Klöß D., Schröder R., Conraths F.J.,

Jedes Jahr treten in Deutschland eine Vielzahl anzeigepflichtiger Tierseuchen und meldepflichtiger Tierkrankheiten auf. Um diese wissenschaftlich auswerten und effektiv bekämpfen zu können sowie den nationalen und internationalen Berichtspflichten nachzukommen, wurde am Institut für Epidemiologie (IfE) in Wusterhausen das Tierseuchen-Nachrichtensystem (TSN) entwickelt. Nutzer des TSN sind die für das Veterinärwesen zuständigen Behörden in den Kreisen, den Ländern und beim Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV).

Seit 1995 wird das TSN als bundesweit einheitliches elektronisches System zur Erfassung aller anzeigepflichtigen Tierseuchen und seit 1997 auch für meldepflichtige Tierkrankheiten verwendet. Seitdem unterliegt das TSN einem dynamischen Entwicklungsprozess, wobei nicht zuletzt der kontinuierliche Dialog mit den Anwendern in den Veterinärämtern zu einer schrittweisen Optimierung der Datenqualität, des Funktionsumfangs und der Anwenderfreundlichkeit beigetragen hat. So geht das TSN bereits in seine dritte Generation. Während TSN 1.0 noch als reines Meldesystem konzipiert war, wurden bereits in seiner zweiten Generation moderne Internettechnologien, ein geographisches Informationssystem (GIS) sowie die ersten Werkzeuge für ein effektives Krisenmanagement integriert. Die aktuelle Version TSN 3.0 wurde nunmehr unter anderem in den folgenden Bereichen wesentlich erweitert:

- (1) In der Benutzerverwaltung: Für beide Komponenten von TSN (TSN-Online und TSN-Veterinäramt) ist jetzt die Vergabe abgestufter Benutzerrechte durch die TSN-Beauftragten der Kreise bzw. Länder selbst möglich.
- (2) In der Meldung von Tierseuchen: Die Meldung erfolgt jetzt ausschließlich Internet-basiert unter Verwendung eines sicheren Übertragungsprotokolls, wie es z. B. auch beim Internet-Banking verwendet wird.
- (3) Im neu entwickelten Krisenmodul: Damit steht nun den Veterinärämtern eine Applikation zur Verfügung, die es im Seuchenfall ermöglicht, sämtliche seuchenrechtlichen Maßnahmen zu planen und zu dokumentieren, die Gesamtzusammenhänge im Blick zu behalten und so eine effiziente Tierseuchenbekämpfung durchzuführen.

- (4) Im Bereich der geographischen Informationssysteme: die diversen Funktionen des Karten-Explorers wurden erweitert und optimiert. Neu ist beispielsweise die Möglichkeit, das Seuchengeschehen auch über Google Maps und Google Earth darzustellen.

Trotz zahlreicher Änderungen wurde an der bewährten Gliederung des TSN in zwei Komponenten – ein Server mit der zentralen Tierseuchendatenbank (ZTSDB) auf der einen und die so genannten *Clients* auf der anderen Seite – festgehalten. Während über TSN-Online sämtliche Daten zur Tierseuchensituation abgefragt werden können, um sie beispielsweise auf der Internetseite eines Landkreises oder bei der Europäischen Kommission vorzustellen, wird das TSN-Veterinäramt zur Verwaltung der Betriebe und – im Ausbruchsfall – des Seuchengeschehens genutzt. Die Abfragen der ZTSDB erfolgen über intuitive Webseiten, die über die Spezifizierung zeitlicher, regionaler und inhaltlicher Parameter schnell die gewünschten Detailinformationen liefern (z. B. Entwicklung einer Tierseuche über die Jahre, etc.). Das BMELV wiederum meldet die Informationen über das ADNS (Animal Disease Notification System) an die Europäische Kommission und über die WAHID (World Animal Health Information Database) an die Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) weiter. Die abgefragten Daten können im **Seuchenobjekt-Explorer** graphisch oder tabellarisch dargestellt und je nach Bedarf in verschiedenen Formaten exportiert werden (Abb. 1).

Abb. 1: Ansicht einer Abfrage über den Seuchenobjekt-Explorer im TSN-Online.

Im Folgenden werden die wichtigsten im TSN gespeicherten Daten und wesentlichen Erneuerungen mit Schwerpunkt auf dem Krisenmodul vorgestellt.

(1) BENUTZERVERWALTUNG

Bisher wurde die Benutzerverwaltung im Online-Teil von TSN zentral in Wusterhausen vorgenommen. Dabei waren jedem Veterinäramt nur ein einziger Benutzername und ein Passwort zugewiesen. Jetzt basiert TSN 3.0 auf einem individuellen System, bei dem jeder berechtigte Nutzer eine eigene Identifikation und Passwort erhält. Um den Verwaltungsaufwand für das IfE in Grenzen zu halten, wurde gleichzeitig auf ein hierarchisches System umgestellt, bei dem Administratoren auf Kreis- und Landesebene Nutzer einrichten und verwalten können. Damit ist es beispielsweise möglich, auf individueller Ebene zu entscheiden, welche Mitarbeiter lesenden und/oder schreibenden Zugriff auf die Daten haben, und sie beim Ausscheiden aus dem Amt zu sperren.

(2) MELDUNG EINER TIERSEUCHE

Um den Lernaufwand der Nutzer gering zu halten, wurde bewusst an der Eingabe von Informationen zum Seuchenobjekt anhand von Auswahllisten festgehalten. Neu ist, dass die Erfassung in einem Internet-Browser realisiert ist. Beim Abspeichern eines Seuchenobjekts wird dieses jetzt direkt in der ZTSDB gespeichert und steht damit ohne Zeitverzögerung allen Nutzern zur Verfügung. Dabei wird der Nutzer bei der Eingabe unterstützt, indem alle obligatorischen Felder farbig markiert sind (Abb. 2). Zu den Pflichtangaben gehören beispielsweise (1) die Lokalisation des betroffenen Bestandes; (2) der Untersuchungsgrund; (3) das Datum der Feststellung und (4) das Datum des Seuchenverdachts; (5) die betroffene Tierart inklusive Alter, Gewicht, Geschlecht und Haltungsform; (6) der vermutete Einschleppungsweg; (7) die getroffenen Maßnahmen und (8) die Entfernung zum nächstgelegenen Nachbarbetrieb mit für die gemeldete Seuche empfänglichen Tieren. Des Weiteren haben die Behörden die Möglichkeit, weitere Angaben zum Seuchenobjekt zu machen, wie z. B. das angewandte Diagnoseverfahren.

Auch die Plausibilität der Eingaben wird überprüft, indem jede Tierseuche nur „ihren“ Daten (Erreger, betroffene Tierart, Diagnoseverfahren etc.) zugeordnet werden kann. Zu diesem Zweck werden so genannte Kataloge verwendet, die eine klar strukturierte Auflistung bestimmter Begriffe enthalten, die wiederum fest miteinander verknüpft werden können. Dadurch wird verhindert, dass versehentlich falsche Angaben gemacht werden und zum Beispiel das Auftreten der Bienenseuche Amerikanische Faulbrut bei einem Rind gemeldet wird. Derzeit wird auch daran gearbeitet, dass die angegebenen Untersuchungsverfahren mit

positivem Ergebnis den Kriterien der in den einschlägigen Verordnungen über anzeigepflichtige Tierseuchen genannten Falldefinitionen entsprechen. Beispielsweise kann ein Ausbruch von Rauschbrand nur festgestellt werden, wenn ein bakteriologischer oder serologischer Befund vorliegt, nicht jedoch allein aufgrund einer klinischen oder pathologisch-anatomischen Untersuchung. Neu in TSN 3.0 ist weiterhin die Zusammensetzung der Seuchenobjekt (SO)-Kennung, die sich jetzt aus dem Jahr, dem Code, mit dem die Tierseuche/Krankheit in den Stammdaten hinterlegt ist, sowie einer fortlaufenden Nummer der Krankheit im betreffenden Jahr zusammensetzt. Dadurch kann anhand der SO-Kennung in etwa abgeschätzt werden, um den wievielten Fall der jeweiligen Seuche/Krankheit es sich im betreffenden Jahr handelt.



Abb. 2: Ansicht der ersten Seite für die Meldung einer Tierseuche, hier am Beispiel Geflügelpest

(3) DAS KRISENMODUL

Für ein effektives Krisenmanagement ist die Visualisierung des Seuchengeschehens essentiell. Voraussetzung ist, dass die Lokalisation aller seuchenrelevanten Betriebe exakt beschrieben wird. Diese so genannte Georeferenzierung ist mittels TSN bereits anhand der Angabe der Adresse möglich. Die Tierhalterdaten können entweder direkt im TSN verwaltet oder bei Bedarf in TSN importiert werden. Hier ermöglicht die Schnittstelle zu in den Veterinärämtern üblichen EDV-Programmen zur Verwaltung von Tierhaltern und Lebensmittel liefernden Betrieben die schnelle Aktualisierung von Betriebsdaten. Dadurch werden Doppelerfassungen vermieden und die Aktualität der Daten, mit denen der Karten-Explorer arbeitet, optimiert. Das fertige Projekt kann anschließend – beispielsweise für den Austausch mit betroffenen Nachbarregionen oder für die Lagedarstellung – per Email verschickt werden.

Stehen mehrere Fälle bzw. Ausbrüche miteinander in Beziehung, besteht die Option, das Seuchengeschehen im Krisenmodul zu verwalten. Dafür wird (in einer separaten Datenbank) eine so genannte Krise angelegt. Kernelemente einer

Krise sind der Primärausbruch sowie alle mit ihm zusammenhängenden Ausbrüche. In Anlehnung an die rechtlichen Grundlagen werden für alle Betriebe, die sich in einem bestimmten Restriktionsgebiet befinden (z. B. in der Tötungszone, im Sperrbezirk oder Beobachtungsgebiet) bestimmte Maßnahmen vorgeschlagen. Diese Maßnahmen sind jedem einzelnen Betrieb zugeordnet und zunächst als noch nicht durchgeführte, erforderliche Maßnahmen gekennzeichnet. Das Krisenmodul berücksichtigt folgende Maßnahmen: (1) Aushändigung der Sperrverfügung – wobei das Krisenmodul auch die automatische Erstellung der Verfügung über eine Serienbrieffunktion für alle Betriebe anbietet, für die eine solche erforderlich ist; (2) Sperrung des Betriebes; (3) Epidemiologische Ermittlung; (4) klinische Untersuchung; (5) Probenahme; (6) Laboruntersuchung; (7) Tötung/Tierkörperbeseitigung, (8) Grobreinigung/Entwesung; (9) Vordesinfektion; (10) Feinreinigung/Schlussdesinfektion; (11) Wiederbelegung; (12) Impfung; (13) Schätzung und (14) Entschädigungszahlung. Im Laufe der sukzessiven Abarbeitung können die Maßnahmen mittels eines Farbleitsystems als eingeleitet, geplant bzw. abgeschlossen gekennzeichnet werden.

Abb. 3: Ausschnitt einer beispielhaften Krise im Krisen-Explorer. In der Tabelle sind zwei Ausbruchsbetriebe zu sehen; im ersten Betrieb sind bereits alle notwendigen Maßnahmen durchgeführt und die Sperre aufgehoben worden.

Der **Krisen-Explorer** verdichtet alle diese Informationen und stellt einen intuitiven Überblick über die Situation dar (Abb. 3). So kann man auf einen Blick erkennen, welche Betriebe in welchen Restriktionszonen liegen, welchen Status sie haben, welche Maßnahmen in welchem Betrieb schon erledigt sind und welche noch durchgeführt werden müssen. So können nicht nur die direkt betroffenen, sondern auch alle weiteren aus epidemiologischer Sicht überwachungsrelevanten Betriebe effizient verwaltet werden. Auf der Grundlage rechtlicher Vorgaben berechnet das Krisenmodul automatisch auch alle Betriebe, bei denen z. B. nach

der abschließenden Desinfektion die Sperrung aufgehoben werden kann. Dies kann sich insbesondere dann als große Hilfe erweisen, wenn Betriebe in verschiedenen Restriktionszonen liegen.

Liegen die Untersuchungsergebnisse vor, können diese im **Untersuchungs-Explorer** verwaltet werden. Bei der klinischen Untersuchung sind dies die Daten über den Beginn und den Abschluss der Untersuchung, die Anzahl auffälliger, unauffälliger und verendeter Tiere sowie eine Bewertung der Ergebnisse. Auch bei der Probennahme kann der Beginn und Abschluss angegeben werden, zudem kann die Anzahl Blut-, Milch-, Sekret-, Kot-, Tupfer-, Organ-, Gewebe-, Körper- oder sonstige Proben angegeben werden. Dem Probenversand werden je ein Datum, eine Auftragsnummer und ein Untersuchungsamt zugeordnet.

Jedem Betrieb können außerdem weitere Kontaktbetriebe mit folgenden Informationen zugeordnet werden: (1) Betriebsdaten des Kontaktbetriebes; (2) Datum und Uhrzeit des Kontakts; (3) Kontaktobjekt (z. B. das Milchfahrzeug); (4) Kontaktart (Tier-, Personen-, Fahrzeugkontakt oder Kontakt über Erzeugnisse); (5) Kontaktgrad (hoch, niedrig, neutral); und (6) Kontakttrichtung. Diese Daten können mit dem **Kontakt-Explorer** verwaltet werden.

Im **Einrichtungsexplorer** können alle seuchenspezifischen und öffentlichen Einrichtungen verwaltet werden. Zu den seuchenspezifischen Einrichtungen gehören das Mobile Bekämpfungszentrum (MBZ), Straßensperren, Verbotsschilder und Schleusen (für Personen, PKW bzw. PKW und LKW). Zu den öffentlichen Einrichtungen zählen beispielsweise das Landratsamt, das Veterinäruntersuchungsamt, die Polizeidienststelle, die Feuerwehr oder das Technische Hilfswerk. Die einzugebenden Daten zur jeweiligen Einrichtung beinhalten das Datum, die Lokalisation und die Angaben zur Nutzungsdauer.

Das Krisenmodul ist weiterhin in der Lage, mit den erfassten Daten z. B. auf Ebene von einzelnen Restriktionszonen Lagerdarstellungen (Abb. 4), Bestandsstatistiken oder Serienbriefe zu erstellen. Um die Ressourcen und Laborkapazitäten abzuschätzen, die voraussichtlich z. B. für die Probenahme im Beobachtungsgebiet notwendig sein werden, kann außerdem die ungefähre Anzahl anfallender Proben mit dem **Modul „Stichprobenberechnung“** kalkuliert werden.

(4) GEOGRAPHISCHES INFORMATIONSSYSTEM

Auch die Funktionen des seit der Version 2 in TSN integrierten GIS, des so genannten **Karten-Explorers**, wurden weiter optimiert. Unter anderem wurden die Layer-Kontrolle neu entwickelt, das Bearbeiten von Attributen verbessert und die Ausgabe der Karten auf Google Earth bzw. Google

Maps ermöglicht. Des Weiteren wurden die in der Bundesrepublik gängigen geographischen Koordinatensysteme (Gauß-Krüger 3. Streifen, UTM 32. Streifen und UTM 33. Streifen) mit entsprechenden Kartenwerken an die Nutzer ausgeliefert.

TSN ALS INFORMATIONSPLATTFORM

Alle TSN-Nutzer, die einen Zugriff auf die ZTSDB besitzen, bilden eine geschlossene Gruppe, die als so genanntes Intranet-Veterinärwesen bezeichnet werden kann. Diese

Nutzergruppe kann TSN als Plattform für spezielle Informationen nutzen, auf die ausschließlich sie Zugriff hat. Zu den angebotenen Informationen gehören z. B. die amtliche Methodensammlung, das Tierseuchenbekämpfungshandbuch und das Nutzer- und Logistikhandbuch für das Mobile Bekämpfungszentrum (MBZ). Des Weiteren stehen eine Adressverwaltung und eine Funktion zur Pflege von Bereitschaftsdiensten zur Verfügung, in der im Krisenfall die Kontaktdaten der entsprechenden Behörden und Ansprechpartner über administrative Grenzen hinweg recherchiert werden können. Die Zahl der Anmeldungen bei TSN-Online ist seit April 2009 kontinuierlich gestiegen (Abb. 5).

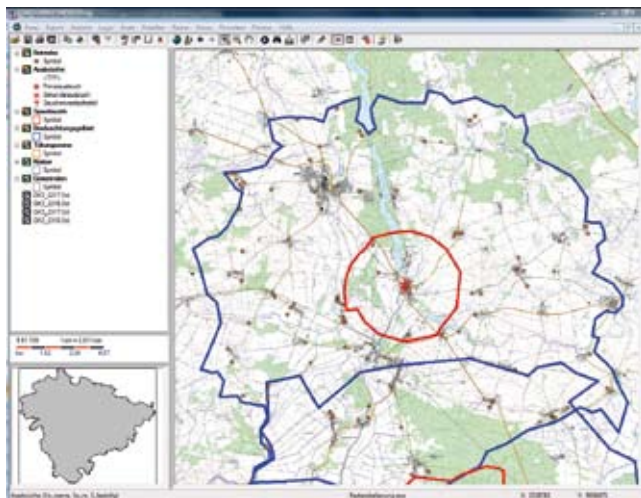


Abb. 4: Lagedarstellung eines beispielhaften, kreisübergreifenden Seuchengeschehens im Karten-Explorer

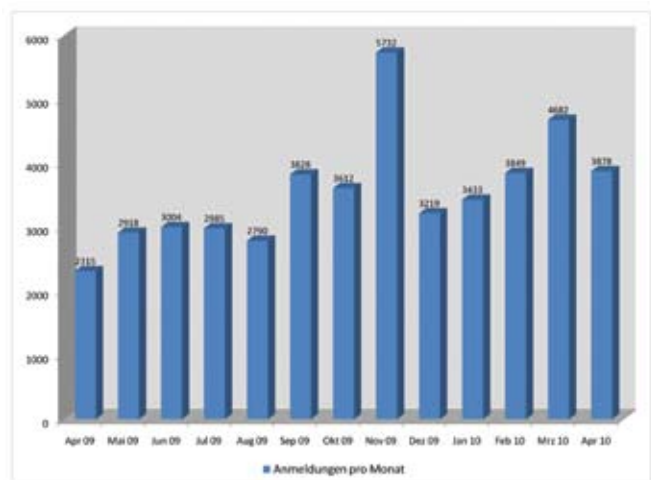


Abb. 5: Anzahl der Anmeldungen bei TSN-Online seit dem 1. April 2009.

Arbeitsgruppe Internationale Tiergesundheit (AG-ITG)

LABORDIAGNOSTIK AVIÄRER INFLUENZA IN ENTWICKLUNGSLÄNDERN: ERFahrungen AUS LAOS, NEPAL UND INDONESIA

Globig, A., Reinking, E., Böhle, W.

Die Hochpathogene Aviäre Influenza (HPAI) vom Subtyp H5N1 erregte bereits im Jahre 1997 breite öffentliche Aufmerksamkeit, als aus dem asiatischen Raum (Hongkong) auch von menschlichen Todesfällen berichtet wurde. In den Jahren 2003/2004 breitete sich das aviäre Influenzavirus (AIV) mit bis dahin ungekannt hohem zoonotischem Potenzial über weite Teile Südostasiens aus. Trotz intensiver Bemühungen, die Ausbreitung durch konsequente Bekämpfungsmaßnahmen zu stoppen, traten insbesondere in Indonesien bald endemische Verhältnisse bei Geflügel auf. Seit 2005 kommt es dort nach wie vor zu durchschnittlich drei humanen Todesfällen monatlich durch H5N1. Auch in anderen Ländern Ost- und Zentralasiens, aber auch in Afrika (vor allem Ägypten) ist das HPAIV H5N1 mittlerweile endemisch geworden.

In Laos ereigneten sich im Jahr 2004 die ersten H5N1-Ausbrüche, die seither in mehreren Wellen und in unterschiedlichen Regionen zu hohen Geflügelverlusten führten und zwei menschliche Todesopfer forderten.

Im Zuge der Ausbreitung des HPAI H5N1 Virus in Bangladesh, Pakistan und Indien meldete im Februar 2009 auch Nepal den ersten und bisher einzigen nachgewiesenen Fall von HPAI H5N1 in Hausgeflügel.

In Ländern mit hoher Populationsdichte, zunehmender Verarmung der ländlichen Bevölkerung und ungezügelter Urbanisierung sind Infektionskrankheiten sowohl im Tier- als auch im Humanbereich aus strukturellen, logistischen, politischen, wissenschaftlichen, kulturellen oder religiösen Gründen nur sehr schwer bekämpfbar.

ONE WORLD, ONE HEALTH

Dass eine unzureichende AI-Bekämpfung in den betroffenen Ländern der Dritten Welt auch Konsequenzen für andere Kontinente hat, zeigte sich spätestens seit 2006 mit der Ausbreitung von H5N1 nach Europa.

Seit Beginn der H5N1-Ausbrüche in Asien wurden deshalb in vielen Industrieländern Mittel mobilisiert, um die Bekämpfung des Virus in den asiatischen Ausbruchregionen verstärkt voranzubringen. Führende Organisationen wie die Weltgesundheitsorganisation WHO, die Welttiergesundheitsorganisation OIE und die Welternährungsorganisation

FAO, aber auch eine Vielzahl an größeren und kleineren nationalen Institutionen, fanden hier Möglichkeiten, sinnvolle Unterstützung zu leisten. Allerdings bestand schließlich die Herausforderung nicht mehr nur darin, gemeinsam mit den Administrationen der betroffenen Länder Bekämpfungsprogramme erfolgreich umzusetzen, sondern die Vielzahl solcher Programme innerhalb eines zunehmend unübersichtlichen „Gebermarktes“ zu koordinieren und zu harmonisieren, um Duplikationen und Vernachlässigungen zu vermeiden und so einen effektiven Einsatz der vorhandenen Mittel zu garantieren.

Wenn die Kommunikation zwischen der Geber- und Empfänger-gemeinschaft gestört ist, bewirken Frustration und Hilflosigkeit eine zunehmende Verslossenheit und gefährden den Erfolg der H5N1-Bekämpfung. Daher ist es unentbehrlich, eine gute und unmissverständliche Kommunikation zwischen den oftmals kulturell recht verschiedenen Gruppen aufzubauen, die häufig ganz unterschiedliche Erwartungshaltungen zeigen. Dieser Prozess ist zeitaufwendig und bedarf viel diplomatischen Geschicks.

ROLLE DER AG-ITG IN DER INTERNATIONALEN TIERSEUCHENBEKÄMPFUNG

Das Konzept „International Health“ oder „One World, One Health“ ist eine der zentralen Herausforderungen unseres Jahrhunderts geworden und wird von führenden internationalen Organisationen wie der WHO, der OIE und der FAO als gemeinsames vorrangiges Ziel formuliert.

Auch das FLI setzt sich für dieses Ziel ein. In Kooperation und mit der Unterstützung diverser FLI-interner Institute, insbesondere der Institute für Virusdiagnostik und für Epidemiologie, sind die Mitglieder der Arbeitsgruppe Internationale Tiergesundheit (AG-ITG) in Dritt- und Dritte-Welt-Ländern aktiv.

In den vergangenen zwei Jahren waren Einsätze der Gruppe speziell im Bereich der Prävention, Diagnostik und Bekämpfung von HPAI H5N1 gefragt. In diesem Zusammenhang erfüllte die AG-ITG Aufträge in Indonesien (Mai 2008) sowie Burkina Faso, Ghana, Kamerun, Nigeria, Senegal und Sudan (Februar bis Mai 2008). Darüber hinaus erfolgte eine längerfristige Laborunterstützung in Laos (Januar bis März und September 2009) und in Nepal (Juni bis August 2009).



AG-ITG-ARBEIT IN LAOS, NEPAL UND INDONESIA

In armen Ländern, in denen eine intakte Infrastruktur nach europäischen Maßstäben keineswegs selbstverständlich ist und personelle wie finanzielle Kapazitäten der Veterinäradministration stark eingeschränkt sind, kann sich gerade eine unzureichende Labordiagnostik als zentraler Flaschenhals bei der Bekämpfung von Tierseuchen erweisen. Dies trifft besonders im Falle der aviären Influenza zu, da diese aufgrund zahlreicher klinischer oder pathomorphologischer Differentialdiagnosen nur labordiagnostisch festgestellt werden kann. Darüber hinaus können vielfältige kulturelle, politische und landesspezifische Eigenheiten den Bekämpfungserfolg zusätzlich schmälern (Tabelle 1).

Der klassische Erregernachweis im Falle der AI erfolgt über die Virusanzucht im embryonierten Brutei, bei der hohe Mengen an infektiösem Virus generiert werden. Für eine Arbeit mit HPAI H5N1 werden daher von der WHO Hochsi-

cherheitslabors (BSL-3) vorgeschrieben, um eine Infektion des Laborpersonals und ein Entweichen des Erregers aus dem Labor zu verhindern. Da viele Labore zum Zeitpunkt des Auftretens von AI nicht über molekularbiologische Diagnostiksetechniken verfügten, mussten sie auf den klassischen Weg der Virusanzucht zurückgreifen, allerdings ohne biosichere Labors, d. h. das Personal blieb ungeschützt und ein Entweichen des Virus aus dem Labor war nicht auszuschließen. Internationale Bemühungen zielten folglich auf den Aufbau von BSL-2- und BSL-3-Laboren, auf die Etablierung von molekularbiologischen Nachweismethoden, um die Virusanzucht abzulösen und auf das Training von Verhaltensweisen im Umgang mit infektiösen, zoonotischen Erregern unter Verwendung von speziellen Schutzausrüstungen. Trotz dieser mehrjährigen Unterstützung und finanziell nicht unerheblichen Aufwendungen ergaben sich daraus weitere Herausforderungen, die es bis heute gilt, mit Kompromissen zu meistern (Tabelle 2).

Art des Einflusses	Einfluss auf	Auswirkung auf Labortätigkeit
Geringe finanzielle Mittel/Haushalt	Gehalt*	Geringe Motivation
	Material	Fehlendes Verbrauchsmaterial, Reagenzien, Geräte, Vernetzung; gesteigertes Improvisationsvermögen
	Energieversorgung / Generator-Betrieb	Energiemangel, zyklisches Auftauen und Einfrieren des Gefriergutes, Geräteschaden
Trockenzeit (Klimawandel)	Verfügbarkeit von Wasser / Wassertank Energiegewinnung Physische und psychische Konstitution	Mangelhafte Hygiene, Wassermangel, schlechte Wasserqualität, u. U. Energiemangel (s. o.), eingeschränkte Arbeitsleistung
Bildung	Ausbildung Umweltbewusstsein Tierschutz Analphabetismus Sprachkenntnis (z. B. Englisch)	Verständnis für Methodik und moderne Gerätschaft (aus dem Ausland), zweifelhafte Entsorgungstechniken (Vergraben in unzureichender Erdtiefe, Verbrennen); Tötungspraktiken; Reinigungstechnik, Biosicherheit
Politisch angespannte Situation	Straßenverkehr Psyche, persönliche Sicherheit	Arbeitsausfall, kein Materialtransport Geringe Motivation Unzuverlässigkeit
Kulturelle Verschiedenheit**	Solidarität und Loyalität in der Gruppe Zusammenleben, Gewohnheiten, Kommunikation	Konflikte, Mobbing Un- und Missverständnis
Religion	Lebensweise (im Alltag), mitmenschlicher Umgang, Hygiene	Arbeitsunterbrechung (z. B. für das Gebet) bis hin zu Arbeitsausfall oder -verbot; Ausübung bestimmter Tätigkeiten durch bestimmten Personenkreis (z. B. Kastensystem im Hinduismus); zweifelhafte Hygiene

* oft weniger als 100 Euro/Monat. Zuverdienst unerlässlich, um Existenz zu sichern

** in vielen Ländern leben bis zu 50 verschiedene (z. T. zerstrittene) Völkergruppen zusammen

Tabelle 1: Politische, kulturelle, sozioökonomische und ökologische Einflüsse auf den Laboralltag in Entwicklungs- und Schwellenländern.

Leider führen reine Sachspenden, beispielsweise ein Sequenziergerät, eine *Real-time*-PCR-Maschine oder elektronische Pipetten, zwar zu einer infrastrukturellen Wertsteigerung, ohne vorherige kritische Evaluierung der konkreten personellen und materiellen Situation sowie bei fehlender Installation und „Nachsorge“ bleiben diese modernen Geräte aber häufig ungenutzt.

Laos und Nepal zählen zu den am wenigsten entwickelten Ländern (Least Developed Countries, LDC) Asiens (<http://www.unohrrls.org/en/ldc/related/62/>). Während in Laos die politische Situation unter der sozialistischen Ein-Parteien-Führung recht stabil ist, sind in Nepal seit mehreren Jahren bürgerkriegsähnliche Zustände in den südlichen Provinzen, aber auch in der Hauptstadt Kathmandu an der Tagesordnung. Diese haben großen Einfluss auf den Arbeitsalltag im Labor (Tabelle 1). Hinzu kommen in Nepal akuter Wassermangel und daraus resultierende mangelnde Versorgung

mit Elektroenergie. In der Trockenzeit zwischen September und Juni kommt es in Kathmandu häufig zu bis zu 16-stündigen Stromsperren. Unter derartigen Umständen ist eine reibungslos funktionierende und moderne Diagnostik nahezu ausgeschlossen. Das Laborpersonal zeigt zwar außerordentliches Improvisationsvermögen (Abb. 1) und ist oft hoch motiviert, doch mangelt es an Aus- und Weiterbildungsmöglichkeiten. In Laos arbeiten nur etwa 20 Tierärzte im öffentlichen Dienst, die Ausbildung zum Tierarzt erfolgt ausschließlich im Ausland. Wegen der schlechten Bezahlung verlassen viele gute Tierärzte das Land oder arbeiten in der Privatwirtschaft.

Da Hilfe zumeist aus englischsprachigen Industrieländern kommt und Gerätschaften mit englischen Anleitungen bereitgestellt werden, können auch mangelnde Sprachkenntnisse des technischen Personals zu einer Barriere werden.

Bereich	Problematik ->	Lösung ->	Entstehende Probleme ->	Kompromiss (Beispiele)
Laborsicherheit	<ul style="list-style-type: none"> - Schlechte Infrastruktur, - fehlende Geräte, - mangelnde Hygiene & Disziplin 	Aufbau BSL-3	Nicht leistbare, hohe Unterhalts- und Wartungskosten, Training?	<ul style="list-style-type: none"> - Einbau von Hepafilter in Abluftkanäle, - ökonomische Verbrennungsöfen, manuelle Behandlung von Abwässern - Langzeittraining - Klasse-II- Werkbänke - Akkreditierung?
Laborausstattung	Oft sehr dürftig	Bereitstellung Geräte, z.B. Sequenzierer, andere hochmoderne Technik	teuer, kompliziert, keine entsprechenden Reagenzien, nicht zielführend, nicht anwendbar, keine Wartungs- und Instandsetzungsmöglichkeiten	<ul style="list-style-type: none"> - Vor Bereitstellung kritische Evaluation der Situation und Möglichkeit der Betreuung; - Bereitstellung von sinnvollen Geräten - Grundausstattung, die der Biosicherheit dient (Autoklav, Werkbänke, Wassertanks, UPS, Destillieranlagen, Generatoren) - Abgabe bereits vorhandener aber ungenutzter Technik an andere Institute/Universitäten
Externe Hilfe	Oft nicht koordiniert -> Duplikationen, zu kompliziert? Einseitig fokussiert	<ul style="list-style-type: none"> - Möglichst Bereitstellung von Geräten gleicher Herkunft, um Wartung und Bestellung von Verbrauchsmaterial zu erleichtern - Kommunikation, Anleitung zur Selbsthilfe (z.B. Biosicherheit, Validierungen, Kalibrierungen), Kooperationsangebote - laborspezifisches Langzeittraining, - Ausweitung Diagnostik auf andere Tierkrankheiten, z.B. MKS, KSP, ASP, NDV, PRRS, IBDV, Entenpest (unter Anwendung PCR-Technik leicht möglich) 		

Tabelle 2: Lösungsansätze für häufige Probleme in den Bereichen Laborsicherheit, -ausstattung und externer Hilfe zur Tierseuchendiagnostik in Entwicklungsländern.



Abb. 1: Improvisationstalent gefragt: Aufbewahrung autoklavierter Glasgeräte in Pokhara, Nepal (links), Umfunktionierung Mikroskop-Box zur PCR-Box Kathmandu, Nepal (oben rechts), Labor Laos zu Beginn des ersten Einsatz (unten rechts).

Bei Trainingsmaßnahmen durch eine Mitarbeiterin der AG-ITG von mehreren Monaten in den Zentralveterinärmedizinischen Laboren in Laos und Nepal stand das praktische Arbeiten vor Ort (sogenanntes On-the-job-training) im Vordergrund. Den Laborangestellten wurden nicht nur die molekularbiologischen Techniken im Rahmen von Routineuntersuchungen nahe gebracht, auch auf die Auswertung der Ergebnisse und die Einführung von Standards zur Garantie von validen Ergebnissen wurde großer Wert gelegt. Ein weiterer Schwerpunkt des Trainings lag in der Vermittlung von Hintergrund- und Basiswissen zur AI, zu verschiedenen Techniken und zur Biosicherheit sowie in Grundlagen zur Guten Laborpraxis, welche den richtigen Umgang z. B. mit Pipetten, Werkbänken, Autoklaven, Entsorgung von infektiösen oder giftigen Laborabfällen einschloss.

In Laos fand das Training zeitgleich mit einem HPAI H5N1-Ausbruch im Geflügel im Februar 2009 statt. Dadurch ergab sich die Gelegenheit, ein solches Ausbruchsgeschehen im Labor, welches durch eine Flut von zu untersuchenden Proben nahezu rund um die Uhr beschäftigt war, zu begleiten.

Zahlreiche tote Hühner und Enten wurden zum Labor transportiert und dort später positiv getestet. Beim Gebrauch der hochsensitiven Technik wie der *real-time* PCR können in solchen Fällen Kontaminationen kaum verhindert werden. Dies gab Anlass, das Laborpersonal speziell darin zu schulen, alle Ergebnisse mittels interner Kontrollen zu verifizieren und stets kritisch zu hinterfragen, um falsch-positive Resultate eindeutig auszuschließen. Schließlich, nach mehrwöchigem intensivem Training, erreichte das nationale laotische Referenzlabor in Vientiane in einem von australischen Spezialisten durchgeführten molekularen und serologischen Ringtest ein Ergebnis von 100 Prozent und stand damit an erster Stelle von insgesamt sieben teilnehmenden südostasiatischen Laboren. Als einziges Labor konnte es in der *real-time* PCR auch H7-positive Proben mittels der FLI-Primer und Sonden identifizieren, und als einziges verwendete es eine Vielzahl von Kontrollen in jedem PCR-Lauf.

In einem der fortschrittlichsten Regionallabore in Indonesien machten neben leichten Kontaminationen von PCR-Re-

agencien insbesondere Schwierigkeiten bei der Interpretation von PCR-Ergebnissen einen Trainingseinsatz erforderlich. Hierbei wurde offensichtlich, dass eine moderne Technik und das Wissen im Umgang mit ihr allein nicht unbedingt erfolversprechend sind, sondern dass nur ein vertieftes Grundverständnis für die zu diagnostizierende Materie gepaart mit technischem Verständnis die Grundlage für eine zweifelsfreie Labordiagnostik bildet. Das Problem konnte während des Trainings gelöst werden.

In Nepal gestaltete sich dagegen ein langfristiges Labor-training etwas schwieriger. Aufgrund der instabilen politischen Situation, die sich z. B. durch Bombendrohungen, Straßenblockaden, Streiks und Demonstrationen äußerte, sowie durch knappe Ressourcen (Wasser- und Strommangel) konnte das Laborpersonal das Labor nicht immer erreichen und der Betrieb technischer Geräte jederzeit unterbrochen werden. Jeden Tag mussten die Pläne geändert werden, es gab keine Aussage oder Struktur, auf die Verlass war. Nur aufgrund der langen Trainingsdauer und nur mit viel Geduld, Ausdauer, Verständnis und Improvisation war es schließlich möglich, einige diagnostische Methoden zu etablieren und technisches Verständnis und praktische Fähigkeiten zu vertiefen.

Das FLI trägt nicht nur mit personeller Hilfe, sondern auch mit der Entwicklung, Evaluierung und Validierung von Diagnostika zum Bekämpfungserfolg in den betroffenen Ländern bei. Zum Beispiel erwiesen sich die vom FLI entwickelten Primer und Sonden zum molekularbiologischen Nachweis der AI (und spezifisch für die Subtypen H5, N1, H7, Pandemic H1N1/2009) mittels (*real-time*) PCR bei Laboreinsätzen in Indonesien und Laos als hervorragend geeignet.

Anstelle von teuren und komplizierten Verfahren wie der Sequenzierung können auch einfache und günstige Methoden wie die Spaltung von PCR-Produkten mit Hilfe eines Restriktionsenzym erste Hinweise auf die Pathogenität von H5N1 geben (Fereidouni *et al.* 2008). Diese am FLI entwickelte Variante der molekularen Pathotypisierung wurde in Laos und Nepal ebenfalls erfolgreich eingeführt. Auf diese Weise kann nicht nur das Selbstbewusstsein der Labormitarbeiter gestärkt werden, sondern es können auch frühzeitige Bekämpfungsmaßnahmen eingeleitet werden.

SCHLUSSBEMERKUNGEN

Internationale Bemühungen haben Schritt für Schritt dazu beigetragen, dass in den meisten Entwicklungsländern eine Laborinfrastruktur vorhanden ist, die eine robuste Diagnostik erlaubt. In den tiermedizinischen Zentrallabors der jeweiligen Länder wurde zudem die konventionelle und zum Teil die *real-time* PCR etabliert. Eine Vielzahl der Länder Asiens, unter anderen Kambodscha, Malaysia, Laos, Bangladesh und Nepal, erhielten auch Sequenziergeräte (ABI 3130), die allerdings bis dato ungenutzt blieben. Von internationalen Organisationen wie FAO und OIE wurden zudem eine Vielzahl an Workshops finanziert und/oder durchgeführt, in denen sich das Laborpersonal das erforderliche Fachwissen aneignen konnte.

Die Arbeit in einem Land mit völlig anderer Kultur stellt Wissenschaftler nicht nur vor rein fachliche Probleme. Vorbehalte, Ängste, Missverständnisse durch Sprache und Kultur können die Bedingungen sehr erschweren. Dies ist umso bedeutender, als ein- oder zweiwöchige Workshops häufig wenig nachhaltige Wirkung zeigen und erfahrungsgemäß erst nach drei bis vier Wochen ein wirkliches Vertrauensverhältnis aufgebaut werden kann. In diesem Zusammenhang erweist es sich als sinnvoll, nationale und internationale Experten in einem Projekt zusammenzuführen, wie es von der FAO in einigen Projekten bewusst praktiziert wird.

Die Ausstattung mit hochwertigen, oft komplizierten Materialien und daher ungenutzten Gerätschaften (und zumal ohne nachhaltiges Training) kann dagegen, ähnlich wie drei-Tage-Workshops in unverständlicher Sprache, reine Geldverschwendung bedeuten.

Da die meisten Länder, aus denen wohl auch in Zukunft verstärkt mit dem Auftreten von zoonotischen Infektionserregern gerechnet werden muss, nicht über stabile infrastrukturelle, personelle und finanzielle Strukturen verfügen, wird es auch weiterhin dringend erforderlich sein, Unterstützung anzubieten. Die Entwicklung von robusten, einfach handhabbaren diagnostischen Testsystemen, die durch die Länder selbst instand gehalten werden oder sogar finanzierbar sind, sollte in den Fokus internationaler Forschungs- und Bekämpfungsprojekte gerückt werden. Diese Systeme sollten letztlich die vielfach vorhandenen hochkomplexen, teuren und aus o. g. Gründen nicht verwendeten Laborausrüstungen ersetzen.

Eine Perspektive könnte Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) darstellen, eine robuste molekularbiologische und sehr spezifische Nachweismethode, die selbst unter einfachen Bedingungen einen ersten, im Vergleich zu konventionellen Schnelltesten sensitiven Hinweis auf das Vorliegen von bestimmten Tierseuchenerregern liefert und damit auch in weniger gut entwickelten Labors durch-

geführt werden kann. Hier gibt es allerdings noch einigen Entwicklungs- und Evaluierungsbedarf (Postel *et al.*, 2010), da die derzeitig verfügbaren LAMPS noch nicht über die erforderliche Sensitivität und Spezifität verfügen.

Schließlich bietet sich die Zusammenarbeit mit anderen OIE-Referenzzentren und Labors auf internationaler Ebene an. Sie wird deshalb von der AG-ITG aktiv angestrebt. Nur eine enge Kooperation aller auf dem Feld der Tierseuchenbekämpfung tätigen Organisationen und Institutionen kann dem Ansatz „One World, One Health“ wirklich gerecht werden.

LITERATUR

- FEREIDOUNI, S. *et al.* 2008. Rapid pathotyping of recent H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and of H5 viruses with low pathogenicity by RT-PCR and restriction enzyme cleavage pattern (RECP). *J Virol Meth* 154:14–19.
- POSTEL, A. *et al.* 2010. Detection of the avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes by commercial loop-mediated isothermal amplification assays. *J Vet Diagn Invest* 22 (in press).

Weitere Literatur kann bei den Verfassern angefordert werden.

IV. LAUFENDE FORSCHUNGSPROJEKTE

1 VIREN

1.1 DNA-VIREN

1.1.1 Familie *Herpesviridae*

Die Familie der *Herpesviridae* umfasst umhüllte Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom und einem charakteristischen Viruspartikel aus Core, ikosaedrischem (T=16) Kapsid, Tegument und Hülle. Herpesviren werden bei vielen Vertebraten und auch bei Nicht-Vertebraten (Mollusken) gefunden. Da sich die bei Säugern, Vögeln und Reptilien vorkommenden Herpesviren phylogenetisch deutlich von denen der Fische und Amphibien sowie der Weichtiere unterscheiden, wurde kürzlich die neue Ordnung *Herpesvirales* mit den Familien *Herpesviridae* (Herpesviren von Säugern, Vögeln, Reptilien), *Alloherpesviridae* (Herpesviren bei Fischen und Amphibien) sowie *Malacoherpesviridae* (Herpesviren bei Weichtieren) etabliert. Die Familie der *Herpesviridae* wird dabei in die Unterfamilien *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae* unterteilt. Wichtige tierpathogene Viren befinden sich besonders in der Unterfamilie *Alphaherpesvirinae*, Gattung *Varicellovirus*. Typvirus ist das humanpathogene Varicella-Zoster Virus (VZV). Hierzu gehören z. B. der Erreger der Aujeszkyschen Krankheit der Schweine (Pseudorabiesvirus, PrV) oder das bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1), das die infektiöse bovine Rhinotracheitis und die infektiöse pustulöse Vulvovaginitis verursacht. Ein generelles Merkmal der Herpesviren ist ihre Fähigkeit, im infizierten Organismus eine lebenslange Latenz auszubilden, aus der die Viren jederzeit reaktiviert werden können.

1.1.1.1 PSEUDORABIESVIRUS

Ziel der Arbeiten ist die Aufklärung der Herpesvirus-Replikation auf molekularer Ebene. Hierzu werden insbesondere durch biochemische (Proteomanalyse), genetische (Virusmutanten) und bildgebende Verfahren (Elektronenmikroskopie, Live-Cell Video Imaging) Infektionen mit PrV und vergleichend mit dem verwandten, humanpathogenen Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) untersucht. Nach der Adsorption an die Zielzelle fusionieren Virushülle und Plasmamembran und das Kapsid wird mit einigen assoziierten Tegumentproteinen entlang von Mikrotubuli zur Kernpore transportiert. Hierfür sind zelluläre Motorproteine verantwortlich. An der Kernpore wird die DNA in den Kern entlassen, wo virale Transkription und Genomreplikation stattfinden. Neue Kapside, in die anschließend die vervielfältigten Genome verpackt werden, bilden sich autokatalytisch im Zellkern. Reife Kapside verlassen den Kern durch Knospung an der inneren Kernmembran und nachfolgende Fusion der primären Virushülle mit der

äußeren Kernmembran (Envelopment/De-Envelopment). Im Zytoplasma findet dann die finale Virusreifung, d. h. Akquisition von Tegument und Umhüllung statt. Durch Exozytose werden die reifen Viren aus der Zelle entlassen. Beide Viren zeigen auch einen deutlichen Neurotropismus, der vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Neuroinvasion, Neurovirulenz und Neuropathogenität dieser Viren erlaubt.

Intrazelluläre Lokalisierung des großen Tegumentproteins pUL36 des Pseudorabies Virus

Das große Tegumentprotein pUL36 ist innerhalb der Herpesviren konserviert und essentiell für die Virusvermehrung. Es interagiert mit einem weiteren konservierten Tegumentprotein pUL37 zur Bildung des inneren, Kapsid-assoziierten Teguments. pUL36 spielt zu frühen Zeitpunkten der Infektion beim Transport der Nukleokapside zur Kernpore und zu späten Zeitpunkten bei der Virusmorphogenese im Zytoplasma eine essentielle Rolle. Die 62 C-terminalen Aminosäuren interagieren mit dem Kapsid-assoziierten pUL25 und initiieren somit vermutlich die Tegumentanlagerung. Unklar war jedoch, ob dies bereits im Kern der infizierten Zelle stattfindet und pUL36 somit möglicherweise an der Freisetzung der Kapside aus dem Kern beteiligt ist. Um die intrazelluläre Lokalisierung von pUL36 und möglicher Spaltprodukte zu untersuchen, wurden gegen verschiedene Bereiche des 3.084 Aminosäuren umfassenden PrV-Proteins monospezifische Antiseren hergestellt und für indirekte Immunfluoreszenzen und Immunmarkierungen infizierter Zellen eingesetzt. Zu keiner Zeit während der Infektion konnte eine pUL36-spezifische Reaktion im Kern infizierter Zellen nachgewiesen werden. Keines der Antiseren reagierte mit primär umhüllten Virionen im Kernspalt, während intrazytoplasmatische Nukleokapside und extrazelluläre reife Viruspartikel eine starke Markierung aufwiesen. Die Expression von pUL36 in Abwesenheit anderer Virusproteine führte hingegen zu einer teilweisen Lokalisierung des Proteins im Zellkern, wobei die dafür verantwortlichen Signale über Reporterproteine identifiziert werden konnten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass pUL36 zwar funktionelle Kernlokalisierungssignale trägt, diese aber vermutlich während der Infektion durch andere viruspezifische Proteine maskiert werden und die Anlagerung an die Nukleokapside ausschließlich im Zytoplasma stattfindet.

Möhl *et al.* (2009). Intracellular localization of the pseudorabies virus large tegument protein pUL36. *J Virol* 83:9641-9651.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Die Abwesenheit des Tegumentproteins pUL37 verzögert den Transport von Pseudorabies Virus Kapsiden zum Zellkern

Nach Fusion der Hülle von Herpesviruspartikeln mit der Plasmamembran der Wirtszelle werden die ins Zytoplasma freigesetzten Nukleokapside aktiv zu den Poren des Zellkerns

transportiert, in den anschließend das Virusgenom eingeschleust wird. Während des Transports verbleiben die inneren Tegumentproteine pUL36, pUL37 und pUS3 an den Kapsiden und könnten deshalb für Interaktionen mit zellulären, Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen verantwortlich sein. Um den möglichen Beitrag von pUL37 zu untersuchen, wurde eine pUL37-deletierte Mutante des Pseudorabies Virus (PrV) konstruiert, die ein Fusionsprodukt aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem nicht essentiellen Kapsidprotein pUL35 exprimiert und deshalb fluoreszenzmarkierte Kapside produziert. Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie infizierter Kaninchennierenzellen konnte gezeigt werden, dass die Viruspenetration in Abwesenheit von pUL37 nicht beeinträchtigt war, der Kapsidtransport zum Kern jedoch gegenüber pUL35GFP-markiertem PrV-Wildtypvirus um etwa 1 h verzögert war. Im Gegensatz dazu zeigten aus pUL37-exprimierenden Zellen gewonnene, phänotypisch komplementierte Virionen eine wildtypähnliche Eintrittskinetik. Folglich ist die Anwesenheit von pUL37 zwar für die Infektionsinitiation von PrV nicht essentiell, aber für eine schnelle Translokation der Nukleokapside zum Zellkern notwendig.

KRAUTWALD *et al.* (2009). Translocation of incoming pseudorabies virus capsids to the cell nucleus is delayed in the absence of tegument protein pUL37. *J Virol* 83:3389-3396.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB

Charakterisierung für die Genomsplaltung und -verpackung relevanter Proteine des Pseudorabies Virus und funktionelle Komplementierung von PrV pUL32 durch das homologe Protein des Herpes Simplex Virus Typ 1

Während der herpesviralen DNA-Replikation entstehen multimere Moleküle, die zu Einzelgenomen gespalten und in Kapside verpackt werden müssen. Beim Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) wurden einige hierfür essentielle Virusproteine wie pUL6, pUL15, pUL28, pUL32 und pUL33 identifiziert, deren Gene auch bei anderen Herpesviren konserviert sind, deren Genprodukte aber noch nicht näher untersucht wurden. Deshalb wurden zur funktionellen Charakterisierung der entsprechenden fünf Genprodukte des PrV durch Mutagenese eines infektiösen Plasmidklons des Virusgenoms Deletionsmutanten in Bakterien generiert. Zur Virusvermehrung mussten transgene eukaryontische Zelllinien hergestellt werden, welche die deletierten Gene exprimierten, da keine der erhaltenen PrV-Mutanten in nicht komplementierenden Zellen replikationskompetent war. DNA-Analysen zeigten, dass in diesen Zellen die Genome aller Virusmutanten zwar vermehrt, aber nicht zu Monomeren gespalten wurden. In den Zellkernen konnten nur unreife Viruskapside nachgewiesen werden, die noch die für den Aufbau nötigen Gerüstproteine, aber keine DNA enthielten. Anders als reife Nukleokapside wurden nur wenige dieser leeren Kapside an der Kernmembran primär umhüllt und im Zytoplasma wurde lediglich die Bildung und Freisetzung

umhüllter Tegumentpartikel ohne Kapside beobachtet. Nach Transfektion von Zellen mit Expressionsplasmiden für die einzelnen PrV-Proteine zeigten Immunfluoreszenzanalysen mit monospezifischen Antisera, dass pUL6, pUL15 und pUL32 aktiv in den Zellkern transportiert werden, während pUL28 und pUL33 überwiegend im Zytoplasma lokalisiert sind. Durch „two-hybrid“ Studien in Hefen wurden physikalische Interaktionen von pUL28 mit pUL33 und pUL15 festgestellt, die vermutlich als Komplex in den Zellkern gelangen und dort die Spaltung und Verpackung der viralen Genome katalysieren. pUL6 konnte auch in gereinigten PrV-Partikeln nachgewiesen werden und bildet wohl die für die DNA-Verpackung und spätere Freisetzung notwendige Portalstruktur. Die genaue Rolle von pUL32 in diesem Prozess blieb zwar bislang unklar, doch zeigte sich, dass der Defekt von UL32-negativem PrV durch das homologe HSV-1 Protein vollständig kompensiert werden kann. Interessanterweise war im umgekehrten Ansatz der Defekt von UL32-negativem HSV-1 durch das PrV-Protein nicht komplementierbar und auch die UL33-Genprodukte waren im heterologen Virussystem nicht funktionell. Somit deuten unsere Studien auf zwar sehr ähnliche, aber nicht völlig identische Funktionen der untersuchten konservierten Genprodukte von PrV und HSV-1 hin.

FUCHS *et al.* (2009). Characterization of pseudorabies virus (PrV) cleavage-encapsidation proteins and functional complementation of PrV pUL32 by the homologous protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 83:3930-3943.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Auswirkungen der gleichzeitigen Deletion von pUL11 und Glykoprotein M auf die Reifung von Pseudorabies Virus und Herpes Simplex Virus Typ 1 Virionen

Das Membran-assoziierte Tegumentprotein pUL11 und das Hüllglykoprotein M (gM) sind innerhalb der *Herpesviridae* konserviert und spielen eine Rolle bei der sekundären Umhüllung von Nukleokapsiden im Zytoplasma. Während Deletionen eines der beiden Gene die Replikation von HSV-1 oder PrV in Zellkultur nur mäßig beeinträchtigen, führt die gleichzeitige Deletion beider Gene zu einer fast vollständigen Inhibition der Virionreifung von PrV, die mit der Bildung großer intrazytoplasmatischer Einschlüsse aus Nukleokapsiden und Tegumentproteinen einhergeht [Kopp *et al.* (2004), *J Virol* 78:3024-3034]. Um zu prüfen, ob ein ähnlicher Phänotyp auch bei HSV-1 zu beobachten ist, wurden aus dem zu diesem Zweck als artifizielles Bakterienchromosom (BAC) klonierten Genom des HSV-1 Stammes KOS die pUL11- und gM-Gene sowohl einzeln als auch gemeinsam deletiert. Während Einzeldelationen von pUL11 oder gM in Affenierzellen (Vero) nur zu ca. 5-fach reduzierten Virustitern und um 40 – 50 % verringerten Plaquedurchmessern gegenüber dem HSV-1 Wildtypvirus führten, waren die Defekte auf Kaninchennierenzellen (RK13) deutlich ausgeprägter (ca. 50fache bzw. 70%ige Reduktionen der Titer bzw. Plauegrö-

Ben). Durch Elektronenmikroskopie wurde wie bereits früher für entsprechende PrV-Mutanten gezeigt, dass in Abwesenheit von pUL11 oder gM auch die Bildung von HSV-1 Virionen im Zytoplasma beider Zelllinien gehemmt ist. Anders als früher für pUL11-negatives HSV-1 beschrieben, konnte eine Beeinträchtigung der Virusfreisetzung aus dem Zellkern nicht festgestellt werden. Die gleichzeitige Deletion von pUL11 und gM führte bei HSV-1 zu additiven Wachstumsdefekten und im Zytoplasma von RK13-Zellen auch zur Bildung großer Einschlüsse aus Kapsiden und Tegumentmaterial. Die Defekte von pUL11- und pUL11/gM-negativem HSV-1 konnten in Zellen, die pUL11 von PrV exprimierten, partiell korrigiert werden. Unsere Studien belegen somit, dass pUL11 und gM von PrV und HSV-1 ähnliche Funktionen bei der Virionreifung im Zytoplasma besitzen.

LEEGE *et al.* (2009). Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 83:896-907.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen UL37-negativen Mutanten des Pseudorabies Virus und des Herpes Simplex Virus Typs

In Abwesenheit des konservierten Tegumentproteins pUL37 ist die Virusmorphogenese von PrV und HSV-1 erheblich beeinträchtigt. In beiden Fällen aggregieren nicht oder nur unvollständig tegumentierte Nukleokapside im Zytoplasma der Wirtszellen und es werden kaum umhüllte Viruspartikel gebildet. Anders als für PrV wurde für UL37-deletiertes HSV-1 ein zusätzlicher Defekt bei der Freisetzung von Nukleokapsiden aus dem Zellkern beschrieben. Dies konnte jedoch durch die aktuellen Studien mit einer neu hergestellten UL37-Deletionsmutante des HSV-1 Stammes KOS widerlegt werden. Hingegen bestätigte sich, dass pUL37 für die produktive Replikation von HSV-1 absolut essentiell ist, während UL37-negatives PrV trotz deutlich reduzierter Titer und Plauegrößen replikationskompetent ist. Parallele Infektionsversuche in Affen- bzw. Kaninchennierenzellen, die pUL37 von HSV-1 bzw. PrV exprimierten, zeigten darüber hinaus, dass die Defekte von UL37-deletiertem HSV-1 und PrV nur durch das jeweils autologe Protein trans-komplementierbar sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass pUL37 von HSV-1 und PrV zwar ähnliche Funktionen haben, jedoch nur im autologen System funktionell sind, weil notwendige Proteinwechselwirkungen, wie z. B. die bekannte Interaktion mit dem Tegumentprotein pUL36, aufgrund struktureller Unterschiede nur zwischen den Genprodukten der gleichen Viruspezies möglich sind.

LEEGE *et al.* (2009). Phenotypic similarities and differences between UL37-deleted pseudorabies virus and herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 90:1560-1568.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

1.1.1.2 BOVINES HERPESVIRUS TYP 1

Identifizierung von Rekombinanten zwischen den bovinen Herpesviren Typ 1 und Typ 5

In Regionen, in denen die eng verwandten bovinen Herpesviren Typ 1 (BoHV-1) und Typ 5 (BoHV-5) gleichzeitig zirkulieren, kann es nach Doppelinfection im Tier zur Entstehung intertypischer Rekombinanten kommen. Da die verfügbaren Reagenzien zur Identifizierung und Charakterisierung derartiger Rekombinanten limitiert sind, wurden an Hand der Genomsequenzen dreizehn PCR Primerpaare abgeleitet, die es ermöglichen, Rekombinationsorte einzugrenzen und diese durch anschließende Sequenzierung der Amplikons genau zu lokalisieren. Die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens wurde an Hand von zwei in Zellkultur erhaltenen intertypischen Rekombinanten geprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass für Rekombinationen zwischen BoHV-1 und BoHV-5 nur sehr kurze homologe Abschnitte benötigt werden und dass diese Methode eine Überwachung der Entstehung von BoHV-1/BoHV-5 Rekombinanten ermöglicht.

Del Médico Zajac *et al.* (2009). Characterization of interspecific recombinants generated from closely related bovine herpesviruses 1 and 5 through multiple PCR sequencing assays. *J Virol Methods* 161:75-83.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB, Deutschland; Virology Institute, Veterinary and Agricultural Science Research Centre, National Institute of Agricultural Technology and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), beide Buenos Aires, Argentinien; Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly, Frankreich; Virology and Viral Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Lüttich, Belgien

Glykoprotein B des bovinen Herpesvirus Typ 1 als Transporter für sezernierte Proteine

Das bovine Herpesvirus Typ1 (BoHV-1) und viele andere (Herpes)Viren werden als Vektoren zur Synthese heterologer Proteine wie Reporterproteine, Antigene oder immunmodulatorisch aktive Moleküle verwendet. Dabei wird die Fremdenexpression von separaten Kontrollelementen gesteuert. Eine alternative Expressionsstrategie für sekretierte Proteine und Peptide nutzt das essentielle BoHV-1 Glykoprotein B (gB) als Transporter. Hierbei wird das Zielprotein im Leseraster des gB exprimiert. Durch flankierende Spaltstellen für die ubiquitäre Protease Furin wird das fremde Polypeptid im trans-Golgi Netzwerk aus dem gB-Vorläuferprotein freigesetzt. Die grundsätzliche Eignung dieser neuartigen Expressionsstrategie wurde mit Hilfe der Sekretion von GFP als Reporterprotein gezeigt. Vermutlich lassen sich auch andere membrangebundene oder sekretierte (Glyko)Proteine so modifizieren, dass sie als Transporter für Oligopeptide oder größere Proteine dienen können.

KEIL (2009). Modified bovine herpesvirus 1 for protein secretion. *Meth Mol Biol* 515:249-260.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB

1.1.1.3 VARICELLA ZOSTER VIRUS

Molekularepidemiologische Untersuchungen zu Herpes simplex-Virus Typ 1 und Varicella-zoster-Virus

Gegenwärtig sind drei verschiedene Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1)-Genotypen (A, B and C) auf der Basis der DNA-Sequenzen der Gene für Glykoprotein E (gE), G (gG) und I (gI) definiert worden. Zur Typisierung der in Deutschland zirkulierenden HSV-1-Wildtypstämme und zum Nachweis möglicher Veränderungen in der molekularen Epidemiologie wurden 569 klinische HSV-1-Isolate aus einer 10jährigen Longitudinalstudie mittels einer PCR-basierten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse von gG und gI genotypisiert und gE-Gen-Sequenzen einer Rekombinationsanalyse unterzogen. Stämme der Genotypen A und B repräsentierten 76 % aller untersuchten Stämme und zeigten eine stabile, geschlechtsunabhängige Verteilung in allen Altersgruppen. Intergenische gG/gI- und intragenische gE-Rekombinanten waren weniger prävalent. Interessanterweise wurde für einen HIV-infizierten Patienten in einer Untersuchungsperiode von drei Jahren ein gG/gI-Genotypwechsel von A/A zu C/A beobachtet.

Zum Verständnis und Monitoring der molekularen Evolution und der Identifikation von Infektionsketten des Varicella-zoster-Virus (VZV) ist eine Feintypisierung der hochprävalenten Genotypen E1 and E2 in Deutschland erforderlich. Deshalb wurde eine einfache PCR-basierte Genotypisierungsmethode zur Differenzierung von E1- und E2-Subtypen entwickelt. Auf der Basis der Analyse von neun offenen Leserahmen (ORF) konnte eine Sequenz von 7.482 Nucleotiden Länge, die die ORF 5, 7 und 62 beinhaltet, identifiziert werden, die informative Sites für die Identifikation neuer Subtypen von E1 (E1a) und E2 (E2a, E2b) enthält. Spezifische single nucleotide polymorphisms (SNP) wurden für die Subtypen E2a und E2b in den ORFs 5, 37 und 62 nachgewiesen, während im ORF56 ein E1a-spezifischer SNP gefunden wurde.

SCHMIDT-CHANASIT *et al.* (2009). A 10-year molecular survey of herpes simplex virus type 1 in Germany demonstrates a stable and high prevalence of genotypes A and B. *J Clin Virol* 44:235-237.

SCHMIDT-CHANASIT *et al.* (2009). Novel approach to differentiate subclades of varicella-zoster virus genotypes E1 and E2 in Germany. *Virus Res* 145:347-349.

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Abteilung Virologie, Hamburg; Institut für medizinische Virologie, Universität Frankfurt; Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universität Rostock; Friedrich-Loeffler-Institut, INNT (alle Deutschland)

1.1.2 Familie *Alloherpesviridae*

Das erst vor etwa zehn Jahren entdeckte Koi Herpesvirus (KHV, Cyprinid Herpesvirus 3) gehört in die neue Familie *Alloherpesviridae* der Ordnung *Herpesvirales*. Bedingt durch den regen Zierfischhandel tritt die KHV-Infektion

mittlerweile fast weltweit bei Kois und Nutzkarpfen auf. Sie verursacht schwere Erkrankungen, die durch Haut- und Kiemenläsionen sowie durch zentralnervöse Störungen gekennzeichnet sind und zu Massensterben in den Beständen führen können. Zur Bekämpfung stehen bislang keine sicheren Impfstoffe und nur wenige diagnostische Hilfsmittel zur Verfügung.

Nachweis des KHV in gesund erscheinenden Fischen

Im Rahmen des EU-Projekts EPIZONE (WP 6.1. Fish diseases) wurden Fisch-Importe aus Ländern, die als KHV-infiziert gelten, auf das Vorhandensein von KHV untersucht. Grund hierfür waren KHV-I-Ausbrüche in europäischen Kulturkarpfen (*Cyprinus carpio*), die in keinem epidemiologischen Zusammenhang mit bekannten Ausbrüchen standen. Neben reinen Zierfischen wie Zierwelsen (*Ancistrus sp.*), Goldfischen (*Carassius auratus*) und Kois (*C. carpio*) wurden auch wirtschaftlich genutzte Fischarten wie Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*), Schleien (*Tinca tinca*) und Orfen (*Leuciscus idus*) untersucht.

Mit Hilfe neu entwickelter PCR-Methoden wurde das KHV-Genom in klinisch gesunden Individuen der untersuchten Fischarten nachgewiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass KHV-infizierte Fische in der Lage sind, die Infektion an naive Karpfen zu übertragen. Unter bestimmten Umständen (Stress) konnte im Experiment eine Erkrankung in vormals klinisch gesunden Carrier-Karpfen ausgelöst werden.

BERGMANN *et al.* (2009). Detection of koi herpes virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 29:145-152.

KEMPTER *et al.* (2009) Koi herpesvirus: Do acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in disease free zones? *Acta Ichthyol Piscat* 39:119-126.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED und IVD; Tierärztliche Hochschule Hannover, (beide Deutschland); Universität Szczecin (Polen)

Nachweis und Differenzierung des KHV mittels PCR und Sequenzanalyse

In Untersuchungen von KHV-Isolaten aus verschiedenen Regionen (Europa, Asien, Nordamerika) konnte gezeigt werden, dass Unterschiede sowohl in den krankmachenden Eigenschaften als auch in verschiedenen Genen des KHV nachzuweisen sind. Isolate aus Asien waren bei höheren Wassertemperaturen (23-26°C) wesentlich virulenter im Vergleich zu europäischen KHV-Isolaten. Diese wiederum waren bei Temperaturen zwischen 16 und 22° C in Bezug auf die induzierte Mortalität virulenter als die asiatischen Isolate.

Da die verglichenen Sequenzen der „offenen Leserahmen“ (ORFs) 56, 81 und 92-94 der untersuchten KHV-Isolate aus den USA, Europa und Asien zu 100 % identisch waren, wurde eine Duplex-PCR mit Primern, welche die ORFs 29 – 31 und 133 umfassen, etabliert. In diesen Regionen des KHV-Genoms wurden Unterschiede zwischen den europä-

ischen/amerikanischen Isolaten auf der einen Seite und den asiatischen Isolaten (Japan, Taiwan) auf der anderen Seite gefunden.

BIGARRÉ et al. (2009). Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. *J Virol Meth* 158:51–57.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED, Deutschland; AFSSA, Brest, Frankreich; National Veterinary Research Institute, Pulawy, Polen; CVI Lelystad, Niederlande

1.1.3 Familie *Papillomaviridae*

Zur Virusfamilie *Papillomaviridae* gehören kleine, 55 bis 60 nm messende, unbehüllte Viren ikosaedrischer Symmetrie und mit einer doppelsträngigen, zirkulären DNA als Genom. Früher wurde die Familie *Papillomaviridae* als Gattung *Papillomavirus* mit der jetzt eigenen Familie *Polyomaviridae* zur Familie *Papovaviridae* zusammengefasst. Papillomviren sind aufgrund ihres Epitheltropismus in der Lage, benigne Tumoren der Epidermis und der Schleimhaut (Papillome, Warzen) bei verschiedenen Tierarten und auch beim Menschen hervorzurufen. Die Entstehung bösartiger Neoplasien aus diesen gutartigen Tumoren wurde bereits frühzeitig beschrieben. Die Vermehrung von Papillomviren ist strikt auf Epithelien beschränkt, wobei ihr Replikationszyklus eng mit der Differenzierung der Epithelzellen verbunden ist. Das Virus infiziert in der Regel die Basalzellen und persistiert episomal in der Zelle. In den suprabasalen Schichten des Epithels kommt es zur Expression früher papillomaviraler Gene, die DNA-Replikation findet im Stratum spinosum und Stratum granulosum statt. Die Expression der Strukturproteine und der Zusammenbau der Viren ereignen sich im Stratum corneum.

Nachweis von Caniner Orale Papillomvirus (COPV)-DNA in epithelialen hyperplastischen Läsionen der Konjunktiva von Hunden

Papillomviren werden auch bei Hunden als Ursache für epitheliale Hyperplasien (Plaques) und Papillome in unterschiedlichen Lokalisationen der Haut und Schleimhaut angesehen. Unsere Untersuchungen belegen, dass sowohl bei einem viral bedingten pigmentierten konjunktivalen Plaque als auch bei squamösen Papillomen bei drei Hunden canine orale Papillomviren (COPV) pathogenetisch beteiligt sind. Fragmente der COPV-DNA (Gene E6, E7 und L1) waren mittels PCR, DNA-Sequenzanalyse und *In-situ*-Hybridisierung (ISH) intraläsional nachweisbar. Histopathologisch wiesen diese Veränderungen unterschiedliche Grade epithelialer Hyperplasie, Akanthose und Hyperkeratose mit Koilozyten auf. Durch ISH war es möglich, COPV-DNA in hochspezifischer Verteilung innerhalb der Kerne hyperplastischer Epithelzellen darzustellen. Es handelt sich um den erstmaligen Nachweis des Lambdapapillomvirus COPV in okulären Epithelhyperplasien.

BRANDES et al. (2009). Detection of canine oral papillomavirus DNA in conjunctival epithelial hyperplastic lesions of three dogs. *Vet Pathol* 46:34–38.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED und IVD; Tierpathologie, Augsburg; Tierärztliche Praxis für Augenheilkunde, München; Tierarztpraxis für Augenheilkunde, Pohlheim; Kleintierpraxis Dierig, Neusäß (alle Deutschland)

1.1.4 Familie *Iridoviridae*

Ranaviren sind weltweit verbreitete Erreger der Familie *Iridoviridae*. Sie verursachen systemische Infektionen mit fokalen hämorrhagischen Nekrosen in inneren Organen, wie Leber, Milz, Niere und Darm, verbunden mit hohen Mortalitäten. Das Wirtsspektrum umfasst Fische, Amphibien und Reptilien. Betroffen sind Tiere in freien Gewässern und in Aquakultur. Ranaviren sind sowohl von ökonomischer als auch ökologischer Bedeutung. Sie stehen im Verdacht, am Rückgang der Amphibienpopulationen beteiligt zu sein.

Untersuchungen zur Empfänglichkeit ausgewählter europäischer Nutzfische für Ranaviren sowie Analysen zur Identifizierung und Differenzierung von Ranaviren

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

Dazu wurden zum einen in Infektionsversuchen die europäischen Nutzfische Wels (*Silurus glanis*), Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) und Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) auf ihre Empfänglichkeit gegenüber ausgewählten, aus Fischen und Amphibien isolierten Ranaviren geprüft. Getestet wurde die Virulenz folgender Erreger: Epizootisches Hämatopoetisches Nekrose Virus (EHNV), European Sheatfish Virus (ESV), European Catfish Virus (ECV), Bohle Iridovirus (BIV) Frog Virus 3 (FV 3), Pike-Perch Iridovirus (PPIV), Shortfin Eel Virus (SERV) Rana Esculenta Virus (REV 282/102), Rana Tigrina Ranavirus (RTRV) sowie die Santee-Cooper Ranaviren: Doctor Fish Virus (DFV), Guppy Virus 6 (GV 6) und das Large-mouth Bass Virus (LMBV). Die Ergebnisse der Infektionsversuche bestätigten, dass die Europäischen Nutzfische Barsch und Forelle nicht für die analysierten Ranaviren empfänglich sind. Es wurden weder klinische Symptome beobachtet noch konnten Virus und virales Genom aus Organmaterial isoliert werden. Lediglich Welse sind sowohl für ESV bei 15° C und 25° C als auch für ECV bei 25° C empfänglich.

Ein weiterer Schwerpunkt innerhalb dieses Projektes war die eindeutige Identifizierung und Differenzierung der Ranaviren. Dazu wurde das vollständige Hauptstrukturprotein-Gen (MCP-Gen) der o. g. Ranaviren identifiziert. Vergleichende Analysen der MCP-Gene geben Hinweise auf die phylogene-

tische Verwandtschaft und eine mögliche Unterscheidung der Ranavirusisolate. Zur Identifizierung und Differenzierung aller Ranaviren einschließlich der Santee-Cooper Ranaviren wurde eine PCR mit anschließender Restriktionsenzym-Analyse etabliert.

HOLOPAINEN *et al.* (2009). Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis Aquat Org* 85:81-91.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED, Deutschland; Department of Large Animal Sciences, University of Copenhagen; Department of Fish, Poultry and Fur animals, National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Århus (both Denmark); Finnish Food Safety Authority Evira, Helsinki, Finland

1.2 RNA VIREN

1.2.1 Familie *Reoviridae*

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

1.2.1.1 ORBIVIREN

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

Virus der Blauzungenkrankheit (BTV)

Die 2008 vom nationalen Referenzlabor begonnenen Forschungsarbeiten über inaktivierte Impfstoffe gegen den Serotyp 8 der Blauzungenkrankheit (BTV-8) wurden im vergangenen Jahr fortgesetzt. Nachdem die unmittelbare Sicherheit und Wirksamkeit der drei in Deutschland eingesetzten Impfstoffe im Rahmen einer Feldstudie bestätigt worden war, wurden weitere Aspekte der BTV-8-Impfung untersucht. Unter anderem wurde die mögliche Nachweis-

barkeit von BTV-Genom durch *real-time* RT-PCR nach Impfstoffeinsatz überprüft und weitestgehend ausgeschlossen. Die Entwicklung und Erprobung von diagnostischen Methoden ist ein Schwerpunkt der Arbeit am nationalen Referenzlabor. In Kooperation mit zahlreichen Kollegen aus ganz Europa wurde im Rahmen des EU-Exzellenznetzwerks EPIZONE eine umfangreiche Publikation zur Anwendung der RT-PCR in der Bekämpfung anzeigepflichtiger Tierseuchen erstellt. Auch die am FLI entwickelten und in vielen Untersuchungsämtern bereits erfolgreich etablierten Serotyp-spezifischen *real-time*-RT-PCR-Methoden für BTV-1, -6 und -8 wurden der Fachwelt vorgestellt. Der BTV-6-Test hatte sich im Herbst/Winter 2008 bereits beim diesbezüglichen Ausbruchsgeschehen in Niedersachsen bewährt. Die hier in enger Zusammenarbeit mit Kollegen am FLI Wusterhausen, in den Bundesländern und am OIE-Referenzlabor in Teramo (Italien) gesammelten Erkenntnisse wurden in einer Publikation zusammengefasst. Weiterhin wurden die Ergebnisse des umfangreichen entomologischen Monitorings von BTV-übertragenden Insektenvektoren der Gattung *Culicoides* abgeschlossen. Dabei konnte durch die PCR-Untersuchung von mehr als 25.000 Poolproben von gefangenen Gnitzen gezeigt werden, dass wahrscheinlich besonders *Culicoides* aus der *Obsoletus*-Gruppe bei der Übertragung von BTV-8 eine Rolle spielen.

ESCHBAUMER *et al.* (2009). Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Vaccine* 27:4169-4175.

HOFFMANN, B. *et al.* (2009). Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* 15:1481-1484.

HOFFMANN B. *et al.* (2009). Real-time quantitative reverse transcription-PCR assays specifically detecting bluetongue virus serotypes 1, 6, and 8. *J Clin Microbiol* 47:2992-2994.

HOFFMANN B. *et al.* (2009). A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet Microbiol* 139:1-23.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMB, IMED und IfE; Freie Universität Berlin; Justus Liebig-Universität Gießen; BMELV Bonn; Universität Regensburg; Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg; Fa. Zecklab, Burgwedel; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Ruhr-Universität Bochum; Leibnitz-Zentrum e. V. Müncheberg (alle Deutschland); Institute Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, UK; Central Veterinary Institute of Wageningen, CVI-Lelystad, The Netherlands; CRL, Virology Department, VLA-Weybridge, UK

1.2.2 Familie *Rhabdoviridae*

Zu dieser Familie gehören behüllte Viren mit einem unsegmentierten RNA-Genom von negativer Polarität. Tierpathogene Rhabdoviren haben eine typische geschossförmige Gestalt mit einer Länge von 100-430 nm und einem Durchmesser von 45-100 nm. Vertreter dieser Familie haben ein sehr breites Wirtsspektrum, wobei einige nur in Säuge-

tieren, Vögeln, Fischen, Arthropoden oder anderen wirbellosen Tieren replizieren. Viele replizieren allerdings sowohl in Arthropoden als auch Wirbeltieren und werden daher zu den Arboviren gezählt. Weitere Vertreter infizieren sowohl Pflanzen als auch sich von Pflanzen ernährende Insekten.

1.2.2.1 LYSSAVIREN

Der typische Vertreter dieser Gattung ist der Erreger der Tollwut (Tollwutvirus, Rabies-Virus). Für zehn der elf bislang bekannten Lyssaviren stellen Fledermäuse das Hauptreservoir dar. Genotyp 1 umfasst den weltweit bei Karnivoren vorkommenden Erreger der „klassischen Tollwut“ (Rabies Virus, RABV). Die Genotypen 2, Lagos bat virus (LBV); 3, Mokola virus (MOKV); 4, Duvenhage virus (DUVV); 5 und 6, European bat lyssavirus 1 & 2 (EBLV-1 & -2); und 7, Australian bat lyssavirus (ABLV) kommen nur in bestimmten geographischen Regionen vor. Für die jüngst isolierten Lyssaviren Aravan Virus (ARV), Khujand Virus (KHUV), Irkut Virus (IRV) und West Caucasian Bat Virus (WCBV) steht eine Klassifizierung noch aus.

Genetische Stabilität (*in vivo*) des oralen Tollwutimpfstoffes SAD B19 unter experimentellen und Feldbedingungen

In Europa gehören SAD (Street Alabama Dufferin)-Stämme, insbesondere SAD B19 und SAD P5/88, zu den am meisten verwendeten Tollwutlebendimpfstoffen für die orale Immunisierung der Füchse.

Die Auslage von Impfködern mit vermehrungsfähigem Lebendvirus stellt jedoch ein gewisses Sicherheitsrisiko für die Umwelt, insbesondere in Hinblick auf die Möglichkeit der Reversion zu oder Erhöhung der Virulenz, dar. Deshalb untersuchten wir zum ersten Mal die genetische Stabilität von SAD B19 (i) nach experimenteller 4- und 10-facher serieller Passage in Füchsen bzw. Mäusen sowie (ii) im Zusammenhang mit Impfstoff-assoziierten Tollwutfällen bei Füchsen aus Deutschland und Österreich aus dem Zeitraum 2001 bis 2006 mittels Kompletengenomsequenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass SAD B19 unter allen Bedingungen eine extrem hohe genetische Stabilität aufweist. Nach zehnfacher serieller Passage in Mäusen wurden keine Mutationen im ca. 12.000 Basenpaar großen Genom beobachtet, während in Füchsen sieben einfache Nukleotidaustausche zwischen der 1. und 4. Passage nachweisbar waren, von denen nur einer einen Aminosäureaustausch an Position 9240 des L-Gens zur Folge hatte. In fünf der sechs SAD B19-Feldisolate im Zusammenhang mit den Impfstoff-assoziierten Tollwutfällen bei Füchsen wurden nur 1 bis 5 Nukleotidaustausche identifiziert, die in bis zu zwei Aminosäureaustauschen im L-Gen im Vergleich zum SAD B19 Prototyp resultierten. Experimentelle Studien zeigten, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Pathogenität des Tollwutvirusimpfstammes hatten.

BECKERT *et al.* (2009). Genetic stability (*in-vivo*) of the attenuated oral rabies virus vaccine SAD B19. *Microbiol Immunol* 53:16-21.
MÜLLER *et al.* (2009) Analysis of vaccine virus associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. *Arch Virol* 154:1081-91.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; IDT Biologika GmbH, Dessau; BMELV, Bonn, Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend, Abteilung Tierschutz, Tierseuchen und Zoonosenbekämpfung, Wien; Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling (beide Österreich); Veterinäruntersuchungsämter

Beiträge zur Verbesserung der post-expositionellen Tollwutprophylaxe (PEP) beim Menschen

Nach Schätzungen der WHO sterben jährlich ca. 55.000 Menschen durch Hundetollwut vor allem in Afrika und Asien; daher bleibt die Tollwut auch heutzutage noch leider eine vernachlässigte Zoonose in diesen Regionen der Welt. Mehr als 90 % aller humanen Todesfälle sind auf Infektionen infolge von Hundebissverletzungen zurückzuführen. In der großen Mehrzahl humaner Tollwutexpositionen benötigen die Patienten unverzüglich eine PEP, welche sowohl eine passive (Tollwutimmunglobuline) als auch eine aktive (Tollwutimpfung) Komponente beinhaltet. Während die Zahl der Opfer, die PEP dringend benötigen, in den letzten Jahren exponentiell ansteigt, sind vor allem humane bzw. equine Tollwutimmunglobuline in Ländern mit endemischer Hundetollwut nicht ausreichend oder oft gar nicht verfügbar. Tollwutvirus-neutralisierende monoklonale Antikörper (mAk) murinen Ursprungs stellen eine vielversprechende Alternative zu humanen bzw. equinen Tollwutimmunglobulinen dar. Wir entwickelten daher in einem WHO-kooordinierten Projekt einmalige mAk Cocktails, die sich sowohl unter *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Bedingungen als hoch effizient erwiesen. Drei neuartige Kombinationen von mAKs zeigten gleiche oder sogar bessere Wirksamkeit im Vergleich zu humanen Tollwutimmunglobulinen. Somit können diese mAk Cocktails als eine potentiell weniger kostenintensive Alternative im Rahmen einer PEP zur Vermeidung humaner Tollwutfälle betrachtet werden, insbesondere in Entwicklungsländern, in denen der Bedarf am höchsten ist. Darüber hinaus wurde anhand von Kreuzneutralisationsstudien mit Humanseren überprüft, inwieweit moderne Zellkultur-basierte inaktivierte Tollwutimpfstoffe, wie die Purified Chick Embryo Cell Vakzine (PCECV) einen Schutz gegenüber Infektionen mit Europäischen (EBLV-1, -2) und Australischen (ABLV) Tollwutviren gewährleistet. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass eine Impfung mit PCECV adäquate Virus-neutralisierende Antikörper sowohl gegen das klassische Tollwutvirus als auch gegen Fledermaustollwutviren wie ABLV, EBLV-1, and EBLV-2 induziert.

MALERCZYK *et al.* (2009). Antibodies induced by vaccination with purified chick embryo cell culture vaccine (PCECV) cross-neutralize non-classical bat lyssavirus strains. *Vaccine* 27:5320-5.
MÜLLER *et al.* (2009). Development of a Mouse Monoclonal Antibody Cocktail for Post-Exposure Rabies Prophylaxis in Humans. *PLoS*

Negl Trop Dis 3:e542. doi:10.1371/journal.pntd.0000542.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, UK; Institut Pasteur, Antiviral Strategy Unit, Paris, Frankreich; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA; Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA; Canadian Food Inspection Agency (CFIA) Centre of Expertise for Rabies, Kanada; World Health Organization, Schweiz; Wistar Institute, Philadelphia, USA; Kansas State University, Manhattan, KS, USA; Novartis Vaccines and Diagnostics, Marburg

Untersuchungen zu Fledermaustollwutvirusinfektionen bei Reservoir- und Nicht-Reservoirspezies

Ungeachtet der jüngsten Forschungsergebnisse sind noch nicht alle Rätsel der Fledermaustollwut entschlüsselt. Beispielsweise wirft die Assoziation von EBLV-1 zu *Eptesicus*-Arten und von EBLV-2 zu *Myotis daubentonii* und *M. dasycneme* sowie die augenscheinliche regionale Häufung von Fällen viele Fragen auf. Serologische Untersuchungen, die für die klassische Tollwutsurveillance undenkbar sind, werden häufig bei der Fledermaustollwut eingesetzt. Diese Untersuchungen werden jedoch durch das Fehlen von validierten Tests erschwert. Gerade die Beantwortung der Frage, ob EBLVs weniger virulent sind oder ob Fledermäuse weniger empfänglich für diese Viren sind, scheint der Schlüssel zum Verständnis dieser Zoonose zu sein. Vor diesem Hintergrund wurden bereits experimentelle Studien mit EBLV-Infektionen in Nicht-Reservoirtieren (Füchsen, Frettchen, Schafen und Große Braune Fledermaus) durchgeführt. Aber auch die experimentelle Infektion von Wasserfledermäusen und zuletzt der Breitflügelfledermaus als eigentliche Reservoirspezies konnte abgeschlossen werden. Um mögliche Übertragungswege zu simulieren, wurden im jüngsten Experiment in 2009 Breitflügelfledermäuse (*E. serotinus*) über verschiedene Infektionsrouten mit EBLV-1 infiziert. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die intramuskuläre Infektionsroute weniger effizient war als die subkutane. Im Gegensatz zur vorangegangenen Studie mit EBLV-1 in der Großen Braunen Fledermaus (*E. fuscus*), in welcher Antikörper sowohl bei verendeten als auch bei Überlebenden nachgewiesen wurden, wurden in keinem Tier Antikörper festgestellt. Interessanterweise wurden hohe Mengen an viraler RNA in der Schilddrüse gefunden, was die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie mit *E. fuscus* bestätigt. Die Bedeutung dieses Nachweises ist derzeit noch unklar. Es wird spekuliert, dass es über eine transiente Infektion der Schilddrüse zu einer hormonellen Dysfunktion kommt, die zum klinischen Bild der Tollwut beiträgt.

FREULING *et al.* (2009). Bat Rabies – a Gordian knot? BMTW 122:425-433.

FREULING *et al.* (2009). Experimental infection of Serotine bats (*Eptesicus serotinus*) with European bat lyssavirus type 1a (EBLV-1a). J Gen Virol 90:2493-502.

FOOKS *et al.* (2009). Detection of High Levels of European Bat Lyssavirus Type-1 Viral RNA in the Thyroid Gland of Experimentally-Infected *Eptesicus fuscus* Bats. Zoonoses Public Health 56:270-277.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; IDT Biologika GmbH, Dessau; Institute of Neurobiology, Eberhard-Karls-University, Tübingen (alle Deutschland); Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, UK; Institut Pasteur, Antiviral Strategy Unit, Paris, Frankreich; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA

Epidemiologische Analysen zur Tollwut in der Türkei

Die Türkei ist derzeit das einzige europäische Land mit hundervermittelter urbaner Tollwut. Obwohl die Bekämpfungsanstrengungen der letzten Jahrzehnte geholfen haben, die Tollwut in einigen Landesteilen zu verringern, gibt es dennoch zahlreiche Regionen, in denen die Tollwut endemisch vorkommt. So sind nach wie vor Menschen, die mit tollwütigen Tieren in Kontakt kommen, gefährdet sich zu infizieren und zu sterben. Vier humane Tollwutfälle wurden im Rahmen einer internationalen Kooperation näher untersucht. Die phylogenetische Untersuchung der Sequenzen dieser Tollwutvirusisolate spiegelte zwar weitestgehend die geographische Verbreitung von Virusvarianten in der Türkei wider, ließ andererseits aber vermuten, dass es zu einer Verschleppung einer Virusvariante gekommen sein musste, die auch zu weiteren Tollwutfällen auf den Golanhöhen im Bereich der israelisch-syrischen Grenze führte.

Besorgniserregend ist auch das massive Neuaufreten von Tollwut beim Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) in der Türkei. Obwohl schon früher sporadische Fälle von Fuchstollwut gemeldet worden sind, ist seit dem Jahr 2000 von einer etablierten Infektion (sustained spill-over) vom Hund auf den Fuchs in der Ägäis-Region auszugehen. Die raum-zeitliche Analyse der Tollwutfälle in dieser Region ergab weitere Hinweise auf eine rasche Ausbreitungstendenz dieses Infektionsgeschehens in nördliche und östliche Richtungen.

UN *et al.* (2009). Genetic analysis of four human rabies cases reported in Turkey between 2002 and 2006. Clin Microbiol Infect 15:1185-1189.

VOS *et al.* (2009). Rabies in Foxes, Aegean Region, Turkey. Emerg Infect Dis 15:1620-1622.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; IDT Biologika GmbH, Dessau (alle Deutschland); Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, UK; Veterinary Control and Research Institute (VCRI), Bornova; Etlik Central Veterinary Control and Research Institute (ECVCRI), Ankara; Ministry of Agriculture and Rural Affairs, General Directorate Protection and Control (GDPC), Ankara; (alle Türkei)

Attenuierung der Replikation und Virulenz des Rabiesvirus durch Picornavirus IRES Elemente

Die Regulation der Genexpression nichtsegmentierter Negativstrang-RNA-Viren (NNSV) erfolgt auf Transkriptionsebene. Dabei bestimmt die Reihenfolge der Gene auf dem Genom die Menge der synthetisierten mRNAs. Bisher gab es keine Möglichkeit, die Expression individueller Virusgene zu kontrollieren, ohne die Genreihenfolge oder die regulierenden Gengrenzensequenzen zu ändern. Während in natürlichen NNSV die Translation der Genprodukte 5'-Cap-abhängig erfolgt, wurden hier einzelne Genprodukte

durch die Insertion verschiedener Picornavirus IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle) von bicistronischen mRNAs 5'-Cap-unabhängig translatiert und so ihre Synthese reguliert. Dazu wurden in Reporter-gen-exprimierenden Rabiesviren (RABV) die Aktivitäten von IRES-Elementen unterschiedlicher neurotroper und nicht-neurotroper Picornaviren in verschiedenen Zelllinien getestet. IRES-Elemente aus humanem Rhinovirus Typ 2 (HRV2) und Poliovirus (PV) waren in allen Zellen aktiv. Im Vergleich zur PV IRES führte die HRV2 IRES generell zu geringeren Reporter-gen-Aktivitäten, unabhängig davon, ob Zellen neuronalen oder nicht-neuronalen Ursprungs infiziert wurden. Die Möglichkeit, in rekombinanten RABV die Genexpression einzelner Gene auf Translationsebene zu regulieren, wurde dazu genutzt, das RABV Phosphoprotein (P) herunter zu regulieren. Rekombinante Viren, die P von einer bicistronischen N-IRES-P mRNA exprimierten, zeigten eine IRES-spezifische Reduktion der Virusreplikation in Zellkulturen und Neuronen in organotypischen Hirn-Schnitt-Kulturen. Die reduzierte P-Expression führte zu einer verstärkten Aktivierung des beta-Interferon (IFN- β)-Promotors und zu einer erhöhten IFN-Sensitivität. Entsprechend zeigten intrazerebrale Infektionen von Wildtyp- und IFN- α -Rezeptor-defizienten Mäusen für die PV- und HRV2-IRES kontrollierten RABV einen Verlust der Virulenz. Die Insertion der HRV2 IRES führte zur stärksten Attenuierung. Hier konnte lediglich in neugeborenen IFN- α -Rezeptor-defizienten Mäusen eine Restpathogenität nachgewiesen werden. Die Kontrolle individueller NNSV-Gene ist eine vielversprechende Strategie zur Attenuierung der NNSV-Replikation und Virulenz.

MARSCHALEK *et al.* (2009) Attenuation of Rabies Virus Replication and Virulence by Picornavirus Internal Ribosome Entry Site Elements. *J Virol* 83:1911-1919.

Max von Pettenkofer Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München; Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Freiburg; Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Freiburg; Friedrich-Loeffler-Institut, Ifl und IMB (alle Deutschland)

1.2.3 Familie *Paramyxoviridae*

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

1.2.3.1 AVULAVIREN

Der typische Vertreter dieser Gattung ist das **Virus der Newcastle-Krankheit (NDV)**, auch als aviäres Paramyxovirus Serotyp 1 (APMV-1) bezeichnet. Die ND ist eine hochkontagiöse Infektionskrankheit des Geflügels, die weltweit vorkommt. Die Empfänglichkeit von Vögeln aus 27 von 50

Ordnungen ist beschrieben, besonders empfänglich gegenüber der Erkrankung sind Hühner und Puten. Zu unterscheiden sind verschiedene Pathotypen. Velo- und mesogene Viren induzieren eine akute systemische Erkrankung und sind anzeigepflichtig. Demgegenüber verlaufen Infektionen mit lentogenen Viren zumeist symptomfrei. Insgesamt sind neun Serotypen (APMV-1 bis -9) der aviären Paramyxoviren beschrieben, wobei der Serotyp 1 bzw. NDV am besten charakterisiert ist.

Entwicklung von Enzym-vermittelten serologischen Testverfahren für das Wassergeflügel

Wassergeflügelseren sind im klassischen Testverfahren für NDV-spezifische Antikörper, dem Hämagglutinationshemmungstest, aufgrund unspezifischer Reaktionen schwierig zu beurteilen. Um eine Absicherung der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde ein ELISA- sowie ein Western Blot-Verfahren entwickelt und anhand von Seren ND-geimpfter Laufenten (*Cairina moschata*) und Gänse (*Anser anser*) überprüft. Legt man die Ergebnisse des Western Blot zugrunde, wies der ELISA eine relative diagnostische Sensitivität bzw. Spezifität von 100,0 % und 91,7 % auf. Demgegenüber lag die relative diagnostische Sensitivität sowie Spezifität beim HAH bei 91,1 % und 97,2 %. Die Untersuchungen konnten belegen, dass der ELISA ein geeignetes Testverfahren darstellt, um die Immunantwort nach ND-Impfung bei Gänsen und Enten zu überprüfen (Häuslaigner, Avian Pathol 2009). Durch diese Arbeiten steht mit dem Western Blot zudem ein sensitives Verfahren zur Verfügung, um fragliche Seren in ihrer Reaktivität zu überprüfen.

HÄUSLAIGNER *et al.* (2009). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to study the specific humoral immune response of Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser var. domestica*) after vaccination against Newcastle disease virus. *Avian Pathol* 38:89-95.

Klinik für Vögel, Universität München; Institut für Veterinärmedizin, Universität München; Friedrich-Loeffler-Institut, IVD und IFE (alle Deutschland)

1.2.4 Familie *Orthomyxoviridae*

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

1.2.4.1 INFLUENZA A VIREN

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

AVIÄRE INFLUENZA

Influenzavirusinfektionen bei Wildvögeln

Aquatisch lebende Wildvögel stellen das wesentliche Reservoir aller in der Natur vorkommenden Influenza A Virussubtypen dar. In diesem Wirtspool perpetuieren die Viren in der Regel ohne größere klinische Auswirkungen auf ihre Wirte. Entsprechende Expositionsmöglichkeiten sowie Dispositionen auf Wirts- wie auf Virusseite vorausgesetzt, sind jedoch auch Übergänge aus diesem Reservoir auf Hausgeflügel und auch auf Säugetiere, den Menschen eingeschlossen, möglich. Adaptieren sich solche zufällig übertragenen Influenzaviren an ihre neue Wirtspezies, so können sich Viruslinien etablieren, die dann unabhängig vom Wildvogelreservoir zirkulieren und unter Umständen sogar Pandemien auslösen können. In jüngerer Zeit waren von solchen artenübergreifenden Übergängen unter anderem Hunde und Katzen betroffen. Eine Zusammenfassung dieser Daten bietet der Übersichtsartikel „Influenza virus infections in dogs and cats“ (Harder und Vahlenkamp, 2009). Die Adaptation niedrigpathogener Influenza A Viren aus Wildvögeln auf Haushühnervögel kann, sofern es sich um Viren der Subtypen H5 oder H7 handelt, zur Entstehung hochpathogener Biotypen führen, die klinisch als Erreger der klassischen Geflügelpest in Erscheinung treten und auch als Zoonoseerreger eine Rolle spielen können.

Ein Monitoring der im Wirtreservoir aquatischer Wildvögel zirkulierenden Influenzaviren hat den Vorteil Kenntnisse über die derzeit prävalenten Viren zu erhalten, ihre molekularen und biologischen Eigenschaften zu charakteri-

sieren und somit Daten für eine Risikoanalyse zu erfassen, die eine Gefährdungseinschätzung der Hausgeflügelpopulation gegenüber Influenzaviren aus dem Wildvogelbereich erleichtert. Hierzu führt das OIE- und Nationale Referenzlabor für Aviäre Influenza am IVD im Verbund mit den Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer sowie dem europäischen Referenzlabor eine umfangreiche Surveillance bei Wildvögeln fort. Ergebnisse aus den Jahren 2008 und 2009 weisen auf eine moderate Prävalenz verschiedenster Subtypen hin, wobei vor allem 2008 etliche Viren der niedrigpathogenen Variante des potentiell gefährlichen Subtyps H5 bei Wildvögeln detektiert wurden (Harder *et al.* 2009). Insbesondere das aktive Wildvogelmonitoring ist mit einem erheblichen Aufwand im Rahmen der Probennahme verbunden; dazu müssen u. U. auch Eingriffe in Habitate streng geschützter Arten vorgenommen werden, die eine sorgfältige Abstimmung mit den Naturschutzbehörden und betreuenden Ornithologen erfordern (Bilk *et al.* 2009; Mühle *et al.* 2009). Es wurde daher untersucht, ob es alternative Methoden zum Fang lebender bzw. zur Beprobung jagdlich erlegter Wasservögel gibt. Die Untersuchung von aviären Kotproben hat sich als eine vielversprechende Ausweichmethode erwiesen, bei der vergleichbar sensitive Virusnachweise und auch Spezieszuordnungen auf ornithologischer bzw. molekularer Basis möglich sind (Pannwitz *et al.* 2009).

In diese Richtung zielen auch Untersuchungen von Weißstörchen, wobei hier parallel zur Beringung der Jungstörche Beprobungen zur virologischen Untersuchung vorgenommen wurden. Zusätzlich wurden frische Kotproben von Störchen sowie tot aufgefundene Tiere einbezogen. Es konnte gezeigt werden, dass Weißstörche offenbar keine Rolle als Reservoir aviärer Influenzaviren spielen und auch nicht in einen interkontinentalen Transfer dieser Viren eingebunden waren (Müller *et al.* 2009). Zwei aufgrund einer Infektion mit dem hochpathogenen Influenzavirus H5N1 im Frühling 2006 in Brandenburg tot aufgefundene Weißstörche hatten sich nachweislich in Deutschland infiziert.

BILK *et al.* (2009). Aviäre Influenza A: Untersuchungen im Rahmen des Wildvogelmonitorings im Land Brandenburg. Beiträge zur Jagd- und Wildtierforschung 34:115-125.

HARDER *et al.* (2009). Vogelpopulationen – Brutstätten pandemischer Influenzaviren? Berl Munch Tierarztl Wochenschr 122:440-445.

HARDER *et al.* (2010). Influenza virus infections in dogs and cats. Vet Immunol Immunopathol 134:54-60.

MÜHLE *et al.* (2009). Bedeutung des Rückganges von Rastplätzen für die Verbreitung von aviären Infektionen bei Zugvögeln am Beispiel des Ramsar-Gebietes Untere Havelniederung. Beiträge zur Jagd- und Wildtierforschung 34:127-137.

MÜLLER *et al.* (2009). Virological monitoring of White Storks (*Ciconia ciconia*) with special emphasis on avian influenza. Avian Dis 53:578-584.

PANNWITZ *et al.* (2009). Active surveillance for avian influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment. J Wildl Dis 45:512-518

Veterinäramt Ostvorpommern, Anklam; Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vor-

pommern, Rostock; Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IfE; Landeslabor Berlin-Brandenburg, Frankfurt (Oder); Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam; District Veterinary Office, Landkreis Märkisch Oderland, Beeskow (alle Deutschland)

Influenzavirusinfektionen bei Hausgeflügel

In den Jahren 2006 - 2008 kam es zu Ausbrüchen von Infektionen mit dem hochpathogenen aviären Influenzavirus (HPAIV) des Subtyps H5N1 in Hausgeflügelbeständen in Deutschland. Die betroffenen Bestände fielen der Keulung anheim und umfangreicher wirtschaftlicher Schaden entstand vor allem durch die massiven flankierenden Sperrmaßnahmen. Die feldepidemiologische Ermittlung der Eintragsursachen gestaltete sich sehr schwierig. Da zeitgleich auch Wildvögel von dieser Infektion betroffen waren, lag der Schluss nahe, dass dort die Quelle der Hausgeflügelinfektionen zu suchen wäre. Für einige Ausbrüche im Jahre 2007 konnte allerdings gezeigt werden, dass hierfür Übertragungen innerhalb des Hausgeflügelsektors verantwortlich waren. Ausgangspunkt waren asymptomatisch mit HPAIV-H5N1 infizierte Mastenten. Bevor die Infektionen in den Mastentenbeständen amtlich festgestellt und gemäßregelt werden konnten, gelangten offenbar Schlachtkörper aus unerkannt infizierten Entenbeständen in den Handel. Infolge unglücklicher Umstände infizierten sich in drei Fällen Hühner aus Hobbyhaltungen an rohen Schlachtkörperabfällen, die auf Komposthaufen entsorgt wurden, zu denen die Hühner Zugang hatten. Diese Indizienkette konnte durch phylogenetische Untersuchungen der an diesen Ausbrüchen beteiligten H5N1-Viren untermauert werden (Harder *et al.* 2009). Dieses Geschehen zeigte eindrucksvoll, dass Enten als Reservoir von HPAIV H5N1 auch hierzulande dienen können. Verstärkte Monitoring-Untersuchungen ergaben allerdings nach Tilgung der infizierten Bestände keine Hinweise für fortgesetzte HPAIV-Infektionen in Entenbeständen in Deutschland.

In den derzeit ausgewiesenen Endemiegebieten des HPAIV H5N1 in Südostasien und Ägypten werden ebenfalls Hausenten für die Perpetuierung des Virus entscheidend verantwortlich gemacht. Da dort neben dem wirtschaftlichen Schaden der Ausbrüche auch menschliche Infektionen mit häufig tödlichem Ausgang vorkommen, hat die Impfung des Hausgeflügels als Bekämpfungsmaßnahme große Bedeutung erlangt. Phylogenetische Untersuchungen der in Ägypten weiterhin zirkulierenden H5N1-Viren zeigten allerdings, dass eine Diversifizierung dieser Viren in unterschiedliche Subkladen des Stammbaumes erfolgt. Möglicherweise ist dies eine Folge einer Antigendrift, bei der die durch Impfung offenbar nur unvollkommen aufgebaute Populationsimmunität als Motor der Selektion fungiert (Abdel-Moneim *et al.* 2009).

Im Rahmen einer umfangreichen Feldstudie wurden Möglichkeiten impfpräventiver Maßnahmen auch bei Hausgeflügel in Deutschland geprüft. Dabei zeigte sich, dass eine

Impfung gegen H5N1 lediglich für Gänsebestände, nicht jedoch für Entenhaltungen Vorteile bringt (Rudolf *et al.* 2009).

ABDEL-MONEIM *et al.* (2009). Sequence diversity of the haemagglutinin open reading frame of recent highly pathogenic avian influenza H5N1 isolates from Egypt. *Arch Virol* 154:1559-1562.

HARDER *et al.* (2009). Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in frozen duck carcasses, Germany, 2007. *Emerg Infect Dis* 15:272-279.

RUDOLF *et al.* (2009). Efficacy of a commercial inactivated H5 influenza vaccine against highly pathogenic avian influenza H5N1 in waterfowl evaluated under field conditions. *Rev Sci Tech OIE* 28:275-291.

Virology Department and Poultry Department, Faculty of Veterinary Medicine, Beni-Suef University, Egypt; Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMB und IfE; Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen und Oberschleißheim; Landeslabor Berlin-Brandenburg, Frankfurt/Oder; Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Oldenburg; Tierärztliche Praxis, Schwerpunkt Geflügelkrankheiten, Delbrück (alle Deutschland); National Veterinary Institute, Pulawy, Polen.

Etablierung molekularbiologischer Methoden für die Subtypisierung von Influenzaviren

Die Subtypisierung der beiden Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) ist integraler Bestandteil der Diagnostik und weiteren Charakterisierung von Influenza A Viren. Klassischerweise geschieht das nach Virusanzucht serologisch-biochemisch im HA- bzw. NA-Inhibitionstest. Der Einsatz hochsensitiver Screeningmethoden in den Monitoring-Programmen oder bei Nachweis von aviären Influenzaviren (AIV) in Geflügelbeständen generiert jedoch eine Vielzahl von Proben mit positivem RNA-Nachweis, aber negativer Virusanzucht. Für diese Proben werden molekularbiologische Methoden für die Subtypisierung benötigt. Im Rahmen des FSI-Programmes 1-3.6 wurden erstmals spezifische singuläre RT-PCR-Tests für alle neun AIV-NA-Subtypen entwickelt und etabliert. Die Validierung der Tests erfolgte zunächst anhand von 43 Referenzisolaten. Im Weiteren wurden 119 AIV-positive diagnostische Proben mit allen neun Tests analysiert. Bei allen Proben wurde der NA-Subtyp erfolgreich detektiert und es traten keine Kreuzreaktivitäten auf. Die diagnostische Spezifität der Tests wurde bestätigt durch die parallele Subtypisierung mittels Sequenzierung und NA-Hemmtest. Auf dieser Basis und unter Einschluss der etablierten Methoden für die HA-Subtypisierung wurde ein universeller Algorithmus für die molekulare Subtypisierung *real-time* RT-PCR-positiver Proben etabliert, der die zeit- und materialaufwändigen (spezifische Antisera) klassischen Methoden ersetzen bzw. ihnen vorangehen kann.

FEREIDOUNI *et al.* (2009). Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Vet Microbiol* 135:253-260.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD und IMB

Massenspektrometrische Identifizierung und Stamm-differenzierung von Isolaten des aviären Influenzavirus (AIV)

Die massenspektrometrische Analyse von Restriktionsfragmenten (restriction fragment mass fingerprint, ‚RFMF‘) wurde als neuartiges Verfahren zur Diagnose von Influenzavirus-Infektionen und zur Typisierung von Isolaten des AIV etabliert. Ausgangsmaterial ist ein durch RT-PCR gewonnenes Amplifikat derjenigen Genregion des Hämagglutinin (HA)-Genes, die für die proteolytische Spaltstelle des HA-Proteins und auch die den Pathotyp bestimmende Umgebung der Spaltstelle kodiert. Nach dem gleichzeitigen Verdau des Amplifikats mit fünf Restriktionsenzymen erfolgt die massenspektrometrische Analyse und die Identifizierung durch Vergleich mit Spektren aus authentischem Material oder Abgleich mit den aus Sequenzdaten berechneten erwarteten Fragmentmassen. Aufgrund der sehr hohen Sequenzabdeckung in den Massenspektren konnten auch unterschiedliche Isolate des Subtyps H5N1 anhand ihrer Spektren eindeutig voneinander unterschieden werden. Voraussetzung für eine schnelle Diagnose im hohen Durchsatz sind möglichst einfache, aber hochspezifische ‚Massensignaturen‘, also einzelne Massen oder Massenkombinationen, die einen bestimmten Subtyp, Pathotyp oder ein bestimmtes Isolat mit hoher Zuverlässigkeit anzeigen. Die *In-silico*-Analyse von etwa 3.500 HA Sequenzen ergab mehrere diagnostisch verwertbare Massensignaturen, die H5 bzw. H5N1-Typen mit 83 bzw. 98 % Sicherheit anzeigen. Die falsch-positiv Rate für H5N1-Subtypen beträgt dabei 1,2 %.

MICHAEL *et al.* (2009). Diagnosis and strain differentiation of avian influenza viruses by restriction fragment mass analysis. *J Virol Meth* 158:63-69.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IVD

Untersuchungen zum Einfluss einer durch niedrigpathogene Influenzaviren induzierten Immunität auf eine nachfolgende Infektion mit hochpathogenem aviären Influenzavirus (HPAIV) vom Subtyp H5N1 bei Stockenten

Bis heute ist nicht sicher geklärt, welche Rolle Wildvögeln bei der Übertragung von HPAIV zukommt. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass bei Wildvögeln aufeinanderfolgende oder gleichzeitige Mehrfachinfektionen mit niedrigpathogenen Viren (LPAIV) keine Seltenheit sind. In einer tierexperimentellen Studie im Rahmen des FSI-Projektes 1-3.6 wurde der Einfluss einer LPAIV-Infektion auf eine nachfolgende Infektion mit HPAIV (H5N1) untersucht, um belastbare Parameter für ein besseres Verständnis von Epidemiologie und Pathogenese von H5N1-Infektionen in natürlichen Ökosystemen zu generieren. Dafür wurden Stockenten mit homo-(H5N2) bzw. heterosubtypischen (H4N6) LPAIV infiziert und sieben Wochen später einer HPAIV-H5N1-Infektion ausgesetzt. Die durch die homosubtypische Infektion

erworbene Immunität schützte die Tiere nach HPAIV-Infektion vor Klinik und führte zu einer drastischen Reduktion der Virusausscheidung. Die heterosubtypische Immunität vermittelte einen ähnlichen, aber schwächer ausgeprägten Effekt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Epidemiologie von H5N1 in Stockenten und möglicherweise weiterem wilden Wassergeflügel massiv durch vorangegangene LPAIV-Infektionen beeinflusst wird und dass solche Tiere durchaus in der Lage sein können, HPAIV über Kurz- und Mittelstrecken zu verbreiten.

FEREIDOUNI *et al.* (2009). Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Infection of Mallards with homo- (H5) and heterosubtypic (H4) Immunity induced by Low Pathogenic Avian Influenza Viruses. *PLoS One* 4:e706

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IFE

Sequenzierung vollständiger Influenza-A-H5N1-Genome

Hochpathogene Influenza A Viren des Subtyps H5N1 sind erstmals 2006 in Deutschland nachgewiesen worden. Influenza-Viren dieses Subtyps haben das Potenzial, Menschen zu infizieren. Eine Infektion von Menschen mit H5N1-Virus führte in rund 60 % der Fälle zum Tode des Patienten. Die Pathogenität des Virus wird von verschiedenen Faktoren determiniert. Detaillierte Information darüber ist nur anhand vollständiger Genomsequenzen der Isolate verfügbar. Im Falle eines Ausbruches ist die genaue Kenntnis über die Pathogenität des Virus schnellstmöglich erforderlich, um zielgenau weitere Maßnahmen ergreifen zu können. Daher wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, die kompletten Genome von Influenza-A-H5N1-Viren direkt aus diagnostischen Proben heraus ohne Kultivierung des Virus sowie ohne Klonierung der mittels RT-PCR aus den Genomsegmenten hergestellten DNA innerhalb von nur drei Tagen zu sequenzieren. Dies bedeutet eine Zeitersparnis von circa 85 % im Vergleich zur klassischen Sequenzierung nach Sanger.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die seit 2006 kommerziell verfügbare Genome Sequencer Technologie etabliert. Beim Genome Sequencer handelt es sich um ein Hochdurchsatzsystem zur DNA-Sequenzierung, mit dem bis zu 100 Mb Rohsequenz in einem Gerätelauflauf (8 Stunden) erzeugt werden können. Die entwickelte Methode fokussiert die Sequenzierung der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren auf die Influenza-Genome, indem diese durch eine einfache RT-PCR amplifiziert werden. Anschließend werden die PCR-Produkte nach einem modifizierten Protokoll in eine Standard-DNA-Bibliothek für die Sequenzierung mit dem Genome Sequencer umgewandelt und sequenziert. Durch Zusammenfügen der erhaltenen kurzen Sequenzabschnitte aus den Rohdaten zu größeren zusammenhängenden Sequenzen, die den einzelnen Genomsegmenten entsprechen, erhält man sehr zuverlässige Sequenzen, in denen jede Base vielfach analysiert wurde. Diese Sequenzen können dann

zur Feindiagnostik verwendet werden. Mit dem vorgelegten Protokoll kann die Zeit zur Ermittlung kompletter Influenza-Genomsequenzen von circa zwei Wochen auf drei Tage verkürzt werden.

HÖPER *et al.* (2009) Simple, sensitive, and swift sequencing of complete Avian Influenza H5N1 genomes. *J Clin Microbiol* 47:674-679

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD

DNA-Chip Entwicklung zur Detektion und Charakterisierung aviärer Influenzaviren

Eine schnelle und robuste Methode zur Charakterisierung von Aviären Influenzaviren (AIV) ist essentiell für die Diagnostik. DNA-Chips (Microarrays) erlauben die simultane Detektion einer Vielzahl von Genen und bieten neue Möglichkeiten. Es wurde ein Microarray-System entwickelt, mit dem Subtypisierungen aller 16 Haemagglutinin- und neun Neuraminidase-Subtypen aviärer Influenzaviren möglich sind. Mit dem ArrayTube-System der Firma CLONDIAG wurde eine kostengünstige Lösung gewählt, die in anderen Bereichen bereits erfolgreich eingesetzt wird. Aufgrund der in Reaktionsgefäße integrierten Microarrays ist das System mit herkömmlicher Laborausstattung kompatibel. Der Test ist relativ einfach und schnell durchzuführen, durch die kolorimetrische Auswertung robust und somit gut für die Routinediagnostik geeignet. Das neue Testverfahren erlaubt die sensitive und spezifische Feinanalyse von AIV aus Virusisolaten und diagnostischen Proben innerhalb von 24 Stunden. Im Zusammenhang mit dem Auftreten des Schweineinfluenza A Virus H1N1-09 wurde das System auch für dieses Virus adaptiert.

GALL *et al.* (2009). Rapid and highly sensitive neuraminidase subtyping of avian influenza viruses by use of a diagnostic DNA microarray. *J Clin Microbiol* 47:2985-2988.

GALL *et al.* (2009). Rapid haemagglutinin subtyping and pathotyping of avian influenza viruses by a DNA microarray. *J Virol Methods* 160:200-205.

GALL *et al.* (2009). Design and validation of a microarray for detection, hemagglutinin subtyping, and pathotyping of avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 47:327-334.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; CLONDIAG GmbH, Jena (beide Deutschland)

Effiziente Universalklonierung von Influenzavirusgenen für schnelle Etablierung von Systemen der reversen Genetik

Die reverse Genetik von Influenza A Viren ist zum unverzichtbaren Werkzeug in Grundlagenforschung und Impfstoffentwicklung geworden. Revers-genetische Systeme ermöglichen die gezielte Herstellung maßgeschneiderter rekombinanter Viren durch Kotransfektion von Plasmiden, die die cDNA aller acht viralen Gensegmente enthalten. Wir entwickelten eine schnelle und universelle Klonierungsmethode für Influenza A Viren, die unabhängig von Restrikti-

onsschnittstellen und DNA-Ligation ist.

In den verwendeten Plasmidvektor pHW2000 wurde der für bestimmte *E. coli*-Laborstämme letale Selektionsmarker *ccdB* flankiert von Influenza-Gensegment-Enden eingeführt. Diese Termini sind bei allen Gensegmenten aller Influenza-A-Stämme hochkonserviert und bleiben während der Klonierung unverändert. Dies erlaubt den Einsatz kürzerer PCR-Primer, was die Synthese großer Mengen an Insert ermöglicht. Die Verwendung des *ccdB*-Gens selektiert gegen den unmodifizierten Ausgangsvektor nach Transformation in kompetente Bakterien. Das resultierende Plasmid pHWScdB wird zusammen mit dem gereinigten PCR-Produkt des Virusgens in einer modifizierten Qikchange™-Reaktion eingesetzt. Die beiden Stränge des PCR-Produktes dienen dabei als Megaprimer und hybridisieren mittels ihrem 3'-Ende mit der entsprechenden Bindungsstelle im Plasmidvektor. Sie werden dann durch Anbau weiterer Nukleotide verlängert. Dabei entstehen relaxierte zirkuläre Moleküle mit Strangbrüchen (target-primed plasmid amplification).

Für die weitere Reduktion der notwendigen PCR haben wir ein Primerpaar mit verkürzten 3'-Enden konstruiert. Dieses Primerpaar ermöglicht es, die Anzahl der notwendigen acht PCR-Reaktionen für die Herstellung von Inserts für jedes Gensegment zu beschränken, da die HA-, NA-, NP-, M- und NS-Gene parallel in voller Länge amplifiziert und dann aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Darüber hinaus ist im Gegensatz zur etablierten PCR für die universelle Amplifikation von Influenzavirusgenen mit diesem Primerpaar die vollständige Amplifikation von NA-Genen aller neun Serotypen möglich.

Mit dieser Methode konnten komplette funktionelle Plasmidsätze der acht Gensegmente von zwölf Influenza A Viren hergestellt werden. Unser neuer Ansatz ermöglicht demnach eine schnelle und verlässliche Klonierung jedes Segments eines beliebigen Influenza A Virus ohne Kenntnis der Sequenzen.

STECH *et al.* (2008). Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res* 36(21):e139.

KREIBICH *et al.* (2009). Simultaneous one-tube full-length amplification of the NA, NP, M, and NS genes of influenza A viruses for reverse genetics. *J Virol Meth* 159:308-310.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB; Philipps-Universität, Institut für Virologie, Marburg (beide Deutschland)

Die Einführung einer polybasischen Spaltstelle in ein niedrigpathogenes aviäres H3N8 Virus führt nicht zum hochvirulenten Phänotyp

Hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) unterscheiden sich von niedrigpathogenen Stämmen durch eine polybasische Spaltstelle im Hämagglutinin (HA) und gehören ausschließlich zum Serotyp H5 oder H7. Um zu untersuchen, ob die Einführung einer polybasischen Spaltstelle in

ein niedrigpathogenes aviäres Influenzavirus mit einem anderem HA-Serotyp für eine unmittelbare Transformation in ein HPAIV ausreicht, wurde mittels reverser Genetik die Spaltstellenregion einschließlich benachbarter Aminosäuren von A/Duck/Ukraine/1/1963 (H3N8) an die der HPAIV A/Chicken/Italy/8/98 (H5N2), A/Chicken/HongKong/220/97 (H5N1) oder A/Chicken/Germany/R28/03 (H7N7) angepasst. Alle drei Spaltstellenmutanten können im Gegensatz zum avirulenten Wildtyp in Abwesenheit von exogenem Trypsin replizieren. Ihre *In-vitro*-Eigenschaften entsprechen daher einem HPAIV. Im Huhn hingegen zeigten sie keine hohe Pathogenität, führten aber im Gegensatz zum avirulenten Wildtyp bei einigen Tieren zu vorübergehenden Erkrankungen. Weiterhin konnten die Spaltstellenmutanten aus Kloakentupfern von Tieren mit klinischer Symptomatik reisoliert werden, was auf eine gesteigerte Replikation *in vivo* hindeutet. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die hohe Virulenz der HPAIV im Huhn nicht nur von einer polybasischen HA-Spaltstelle, sondern darüber hinaus von weiteren Determinanten im HA selbst oder in den anderen viralen Proteinen abhängt. Daher ist der notwendige Erwerb einer polybasischen HA-Spaltstelle durch ein niedrigpathogenes Vorläufervirus nur ein Schritt in der Evolution zum HPAIV.

STECH *et al.* (2009). Acquisition of a Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site by a Low-Pathogenic Avian Influenza Virus Is Not Sufficient for Immediate Transformation into a Highly Pathogenic Strain. *J Virol* 83:5864-5868.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB

Entwicklung viraler Vektorvakzinen/Markervakzinen (gegen H7 HPAIV)

Hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) der Subtypen H5 und H7 verursachen hohe Mortalitäten und wirtschaftliche Verluste in Geflügelbeständen. Daneben sind aber auch niedrigpathogene AIV der Subtypen H5 und H7 gefürchtet, da diese bei Zirkulation in Geflügelbeständen zu hochpathogenen Viren mutieren können. Dies kann durch den Einsatz von Inaktivatvakzinen sogar noch begünstigt werden, wenn Geflügel zwar vor Erkrankung geschützt, aber die Ausscheidung von im Feld kursierenden AIV nicht vollständig verhindert wird, da eine Unterscheidung von infizierten und vakzinierten Tieren (DIVA-Prinzip) mit Vollvirusimpfstoffen nicht oder nur schwer möglich ist.

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Schutzwirkung potentieller Markerimpfstoffe gegen HPAIV vom Subtyp H7 untersucht. Dazu wurde in den viralen Vektoren vesikuläres Stomatitisvirus (VSV) bzw. Newcastle Disease Virus (NDV), das H7 Hämagglutinin exprimiert, und die entsprechenden Rekombinanten zur Immunisierung spezifisch pathogenfreier Hühner eingesetzt. Beide Rekombinanten schützten die Tiere gegen eine tödliche H7 HPAIV-Infektion. *Real-time* RT-PCR Analysen von Tupferproben aus Rachen und Kloaken zeigten, dass die Ausscheidung des Belastungsvirus in

immunisierten Hühnern gegenüber nicht-immunisierten Kontrolltieren stark reduziert war. Darüber hinaus waren mittels eines kommerziell erhältlichen ELISAs auf Basis des AIV Nukleoproteins immunisierte Tiere von immunisierten und nachfolgend AIV-infizierten Tieren einfach serologisch unterscheidbar. Während die Replikations-inkompetente H7 Hämagglutinin-exprimierende VSV-Rekombinante eine individuelle Applikation erfordert, erlaubt die auf NDV basierte Lebendvirusvakzine auch die Verabreichung über Massenapplikationsverfahren. Allerdings bleibt die Wirksamkeit der NDV-Rekombinanten bei Verabreichung über Spray oder Trinkwasser noch zu prüfen. Darüber hinaus induzierte die H7 Hämagglutinin-exprimierende NDV-Rekombinante in Hühnern auch Schutz gegen klinische Erkrankung nach einer letalen NDV-Belastungsinfektion, womit diese Rekombinante bei prophylaktischem Einsatz zugleich als bivalente Vakzine gegen zwei bedeutende Infektionskrankheiten des Geflügels, aviäre Influenza und Newcastle Disease, genutzt werden könnte.

KALHORO *et al.* (2009). A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1). *Vaccine* 27:1174-1183.

SCHRÖER *et al.* (2009). Vaccination with Newcastle Disease Virus Vectored Vaccine Protects Chickens Against Highly Pathogenic H7 Avian Influenza Virus. *Avian Dis* 53:190-197.

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Friedrich-Loeffler-Institut, IMB, IVD und IMED, (beide Deutschland)

Die Impfung mit einer Newcastle Disease Vektorvakzine schützt Hühner vor einer Infektion mit hochpathogenem aviärem Influenzavirus vom Subtyp H7

Die Herstellung eines rekombinanten Newcastle Disease Virus (NDV), das das Hämagglutinin (HA) des hochpathogenen aviären Influenzavirus H7N1 (Italy) exprimiert, erfolgte analog zum bereits beschriebenen NDVH5, indem das HA-Gen in das NDV-Genom zwischen den NDV-Genen F und HN, die für das Fusionsprotein und das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein kodieren, inseriert wurde. Die erfolgreiche Expression des H7-Proteins konnte sowohl durch Western Blot im Lysat als auch in der indirekten Immunfluoreszenz infizierter Zellen gezeigt werden. Das H7-Protein wurde immunoelektronenmikroskopisch auf der Virushülle nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass es in die Hülle des NDV eingebaut wird. Der Nachweis des H7-Proteins in gereinigten Virionen durch Western-Blot-Analyse bestätigte dies.

In einem Tierversuch, bei dem drei Wochen alte, spezifisch pathogenfreie Hühner immunisiert und nach drei Wochen mit dem homologen hochpathogenen Influenzavirus H7N1 (Italy) infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit dem rekombinanten NDVH7 vor einer AIV-H7 Infektion schützt. Keines der immunisierten Tiere erkrankte, während nicht-immunisierte Tiere innerhalb von vier Tagen starben. Der Nachweis Influenza-spezifischer Antikörper, die nicht gegen das HA gerichtet sind (z. B. gegen

das Nukleoprotein), erlaubt außerdem eine Unterscheidung zwischen infizierten und immunisierten Tieren, womit ein solches rekombinantes NDV für die Herstellung einer Markervakzine gegen hochpathogenes aviäres Influenzavirus vom Subtyp H7 geeignet ist.

SCHRÖER, D. *et al.* (2009). Vaccination with Newcastle Disease Virus Vected Vaccine Protects Chickens Against Highly Pathogenic H7 Avian Influenza Virus. *Avian Dis* 53:190-197.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB, IVD und IMED

Herstellung und Evaluierung H5 Hämagglutinin- und N1 Neuraminidase-exprimierender ILTV-Rekombinanten als potentielle Lebendvirus-Vakzinen zum Schutz von Hühnern gegen Infektion mit hochpathogenen aviären Influenzaviren (HPAIV)

Für die Immunität gegen HPAIV-Infektionen sind vor allem Antikörper gegen das hochvariable virale Hüllglykoprotein Hämagglutinin relevant. Bereits in frühen Studien konnten wir Hämagglutiningene der Subtypen H5 und H7 in rekombinanten ILTV-Viren exprimieren und mit diesen nach Lebendvirusimpfung in Hühnern eine belastbare Immunität gegen die homologen HPAIV induzieren [Lüschow *et al.* (2001), *Vaccine* 19, 4249-4259; Veits *et al.* (2003), *J Gen Virol.* 84, 3343-3352]. Allerdings vermittelten die verfügbaren Mutanten nur einen partiellen Schutz gegen neuere asiatische H5N1 HPAIV. Deshalb wurde nun ein ILTV-Vektor generiert, der die rasche Insertion beliebiger Fremdgene anstelle des viralen dUTPase-Gens erlaubte. Durch die dUTPase-Deletion wurde die ILTV-Replikation in Zellkultur nicht erkennbar beeinträchtigt, aber eine ausreichende Abschwächung in infizierten Hühnern erreicht. In den Vektor wurden alternativ die aus einem aktuellen HPAIV isolierten Gene für das H1-Hämagglutinin oder die N1-Neuraminidase eingefügt, da letztere auch als wichtiges Influenzavirus-Antigen gilt. Außerdem wurde die Expression der Fremdproteine unter Kontrolle eines starken Zytomegalievirus-Promotors durch zusätzliche Einführung synthetischer Intronsequenzen gegenüber unseren früheren Konstrukten erheblich gesteigert. Nach einmaliger okulärer Immunisierung mit den neuen ILTV-Rekombinanten entwickelten alle Hühner H5- oder N1-spezifische Serumantikörper. Trotzdem starben alle mit N1-ILTV geimpften Tiere nach anschließender okulonasaler Belastungsinfektion mit H5N1-HPAIV, wenngleich die Überlebenszeiten im Vergleich zu nicht-immunisierten Kontrollen verlängert waren. Im Gegensatz dazu überlebten alle mit H5-ILTV vakzinierten Tiere letale Belastungsinfektionen mit verschiedenen HPAIV vom H5 Subtyp. Während nach Infektion mit homologem oder heterologem H5N1-HPAIV (Aminosäuresequenzhomologie des Hämagglutinins $\geq 96,1$ %) keinerlei klinische Symptome auftraten, zeigten 20 % der mit einem italienischen H5N2-HPAIV (Sequenzhomologie 93,8 %) belasteten Tiere kurzzeitig leichte Entzündungen an den Infektionsstellen. Durch *real-time* RT-PCR-Analysen von Tupferproben konnte gezeigt werden, dass die

HPAIV-Vermehrung und Ausscheidung in den geschützten Tieren auf den Respirationstrakt beschränkt blieb und gegenüber nicht geimpften Kontrollen erheblich vermindert war. Nach gleichzeitiger Immunisierung mit H5- und N1-ILTV wurde sogar eine sterile Immunität gegen das homologe H5N1-HPAIV erreicht, d. h. die Influenzavirus-Ausscheidung vollständig unterbunden. Somit könnte H5-ILTV, eventuell ergänzt durch N1-ILTV eine schnelle und wirksame Schutzimpfung gefährdeter Hühnerbestände gegen HPAIV-Infektionen ermöglichen, die, anders als herkömmliche inaktivierte Influenzavakzinen, eine einfache serologische Unterscheidung geimpfter und Feldvirus-infizierter Tiere anhand der Ab- oder Anwesenheit von Antikörpern gegen weitere Influenzavirus-Genprodukte wie das Nukleoprotein erlaubt.

PAVLOVA *et al.* (2009). Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase. *Vaccine* 27:773-785.

PAVLOVA *et al.* (2009). Live vaccination with an H5-hemagglutinin-expressing infectious laryngotracheitis virus recombinant protects chickens against different highly pathogenic avian influenza viruses of the H5 subtype. *Vaccine* 27, 5085-5090.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB

Die Verbreitung der Influenzavirusinfektion in der Maus sowie die Depletion von Lymphozyten ist abhängig von der viralen Polymerase

SC35M ist eine Maus-adaptierte Variante des hochpathogenen aviären Influenzavirus SC35. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Adaptation vom Vogel auf den Säuger durch Mutationen in der viralen Polymerase unterstützt wurde. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Virusausbreitung und der Organtropismus in Mäusen nach Infektion mit entweder SC35 oder SC35M verglichen. Während eine Infektion mit SC35 nur zu einer leichten Bronchiolitis in den Mäusen führte, zeigten Mäuse, die mit SC35M infiziert wurden, eine starke hämorrhagische Pneumonie. Weiterhin konnte Virus in anderen Organen inklusive dem Gehirn nachgewiesen werden. Nach Infektion mit SC35M wurden virale RNA und Antigen in Monozyten und Makrophagen nachgewiesen. Weiterhin konnte die produktive Infektion von Lymphozyten und Makrophagen *in vitro* nach SC35M Infektion, jedoch nicht nach SC35 Infektion gezeigt werden. In SC35M-infizierten Mäusen wurde zudem eine Lymphopenie induziert. Diese Untersuchungen zeigen, dass die virale Polymerase für die Depletion der Leukozyten verantwortlich ist, was zu einer Immunsuppression und zu einer systemischen Virusausbreitung führt.

GABRIEL *et al.* (2009). Spread of infection and lymphocyte depletion in mice depends on polymerase of influenza virus. *Am J Pathol* 175:1178-86.

Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie; Friedrich-Loeffler-Institut, IfI; Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Pathologie, Abteilung für Molekulare Pathologie, Tübingen (alle Deutschland); Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, UK

PANDEMISCHE INFLUENZA

Das neue pandemische Influenza A Virus vom Subtyp H1N1 bildet auf Sequenzebene zwei unterscheidbare Hauptgruppen

Aufgrund der effizienten Mensch-zu-Mensch-Übertragung des neuen pandemischen H1N1-Influenzavirus ist davon auszugehen, dass es auch weiterhin parallel zu den saisonalen Influenzaviren zirkulieren und weiter verbreitet werden wird. Dieses neue Virus repräsentiert eine bis dahin nicht bekannte Kombination von Gensegmenten der amerikanischen und eurasischen Schweineinfluenzalinien. Es weist hohe Evolutionsraten sowohl für die einzelnen Gensegmente als auch für das gesamte Genom auf.

Eine Analyse der Nukleotid-Zusammensetzung aller acht Gensegmente der aus der Genbank verfügbaren kompletten Sequenzen (mehr als 300) ergab, dass schon kurz nach dem ersten Auftreten zwei eng verwandte, aber unterscheidbare Virusgruppen zeitgleich in den meisten betroffenen Ländern zirkulierten. Die beiden Gruppen unterscheiden sich durch insgesamt neun Nukleotidaustausche, die auf den für die beiden Oberflächenproteine HA und NA sowie die vier inneren Proteine PB2, NP, M und NS kodierenden Genen liegen. Die Gene für PB1 und PA dagegen sind für alle Isolate uniform. Phylogenetische Analysen (Neighbour joining, Maximum likelihood und Bayesian analyses) bestätigten das gleichzeitige Auftreten von zwei unterscheidbaren Gruppen des neuen H1N1 Influenzavirus. Das Ergebnis dieser Analysen trägt zur Kenntnis über das neue Virus bei und bietet eine Basis für weitere Analysen mit dem Ziel einer molekularen Epidemiologie.

FEREIDOUNI *et al.* (2009) Differentiation of two distinct clusters among currently circulating influenza A (H1N1) viruses. *Eur Surveill* 14:19409-19411.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD und IMED

Pathogenese und Übertragbarkeit des A/H1N1/2009 Influenzavirus („Neue Grippe“) nach experimenteller Infektion in Schweinen

Das für die momentane Pandemie verantwortliche Influenza A/H1N1 Virus enthält Gensegmente, die bei bekannten nordamerikanischen und eurasischen Schweine-Influenzalinien vorkommen.

Um Ergebnisse zur Dynamik der Virusreplikation, zu klinischen Symptomen und zur Virustransmission in Schweinen zu erhalten, wurden die Tiere intranasal mit dem Influenzavirus A/Regensburg/D6/09/H1N1 infiziert. Virusausscheidung konnte mit Hilfe von Nasentupfern bereits einen Tag nach der Infektion detektiert werden. Die Schweine zeigten insgesamt eine milde Klinik mit leichtem Fieber, Niesen, Nasenausfluss und Durchfall. Kontakttiere infizierten sich, schieden Virus aus und entwickelten vergleichbare klinische Symptome wie die inokulierten Tiere. Die Plasmaproben aller Tiere wurden negativ für Virus-RNA getestet. Sieben

Tage nach der Infektion konnten weder NP- noch H1-spezifische Antikörper mit Hilfe des ELISA detektiert werden. Jedoch war sehr schnell nach Infektion eine Aktivierung der CD4+ T Zellen messbar, gefolgt von einer Expansion der CD4+ und CD8+ T Zellen, die mit dem Verschwinden der klinischen Symptome einherging.

Bei Hühnern, die als Kontaktiere zugestellt wurden, konnte keine Infektion in Form von Virusausscheidung, klinischen Symptomen oder Serokonversion gemessen werden.

LANGÉ *et al.* (2009). Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J Gen Virol* 90:2119-2123.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED, IVD und IMB

1.2.5 Familie *Bunyaviridae*

Die Familie *Bunyaviridae* beinhaltet fünf Gattungen. Zu den Gattungen *Hantavirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* und *Phlebovirus* gehören eine Reihe von tierpathogenen und Zoonoseerregern, wie beispielsweise Hantaviren, Krim-Kongo-Hämorrhagisches Fieber-Virus und Rifttalfiebertvirus. Ein weiteres Genus, *Tospovirus*, beinhaltet ausschließlich pflanzenpathogene Viren. Außer bei Hantaviren erfolgt die Übertragung der Bunyaviren auf Mensch und Haustier durch Arthropoden, wie Mücken und Zecken.

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

1.2.5.1 HANTAVIREN

Hantavirus-Infektionen können beim Menschen zwei unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen, das Hämorrhagische Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) und das Hantavirale kardiopulmonale Syndrom. Die Art und Schwere der klinischen Symptomatik der humanen Infektionen wird maßgeblich durch die Hantavirus-Spezies bestimmt und reicht von klinisch inapparenten Infektionen über grippale Symptome bis zu tödlichen Verläufen. Bei Infektionen mit den amerikanischen Hantaviren Sin Nombre-Virus (SNV) und Andesvirus (ANDV) wird eine Letalität von bis zu 40 % beobachtet. In Europa und Asien liegt die Letalität, in Abhängigkeit von der Hantavirus-Spezies, bei 0,1 – ca. 12 %. Das natürliche Reservoir für Hantaviren sind wild lebende persistent infizierte Nagetiere. Daneben sind in den vergan-

genen Jahren neuartige Hantaviren bei Spitzmäusen und Maulwürfen gefunden worden, über deren Humanpathogenität jedoch bisher nichts bekannt ist. In der Regel ist eine Hantavirus-Art immer eng mit einer Reservoir-Tierart oder sehr nahe verwandten Arten der gleichen Gattung assoziiert.

In Deutschland sind Hantavirus-Infektionen seit Mitte der 1980er Jahre bekannt. Die durchschnittliche Antikörperprävalenz in der Bevölkerung liegt bei ca. 1-2 %. Nach Einführung der Meldepflicht im Jahr 2001 sind jährlich durchschnittlich etwa 70 bis 240 Fälle gemeldet worden. Im Jahr 2005 und insbesondere im Jahr 2007 ist jedoch ein deutlicher Anstieg der Zahl der gemeldeten Fälle registriert worden. Die am meisten betroffenen Regionen lagen in den Bundesländern Baden-Württemberg, Bayern, Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen. Bisher sind in Deutschland drei Hantavirus-Arten nachgewiesen worden: das Rötelmäuse-übertragene *Puumalavirus* (PUUV), das von der Feldmaus (*Microtus arvalis*) übertragene *Tulavirus* (TULV) und das *Dobrava-Belgrad-Virus* (DOBV), dessen natürlicher Wirt in Deutschland bisher nicht bekannt war.

Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“: Identifikation von Hantavirus-Reservoiren und Longitudinalstudie zu Hantavirus-Infektionen in Reservoirwirten

Wegen der begrenzten Kenntnisse zur geographischen Verbreitung und Häufigkeit von Hantavirus-Infektionen in den Nagetier-Reservoiren und deren Schwankungen wurde in Deutschland das Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“ etabliert. Das Ziel des Netzwerkes besteht in der Etablierung einer Plattform für interdisziplinäre Untersuchungen zur Nagetier-Populationsdynamik, Prävalenz und Evolution von Hantaviren und anderen Nagetier-assoziierten Zoonoseerregern und den zugrunde liegenden Mechanismen sowie deren Auswirkungen auf die Häufigkeit humaner Infektionen. In enger Kooperation mit verschiedenen Forschungseinrichtungen wurde ein Monitoring von Hantaviren in Nagetieren in Endemiegebieten, wie Baden-Württemberg, Bayern, Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen, und Regionen mit einer geringen Zahl humaner Fälle, wie Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Schleswig-Holstein, Hessen, Rheinland-Pfalz, gestartet.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte erstmals die Brandmaus (*Apodemus agrarius*) als Reservoirwirt des Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV) identifiziert werden. DOBV-infizierte Brandmäuse konnten serologisch und molekularbiologisch in einem Landkreis in Niedersachsen, in mehreren Landkreisen Mecklenburg-Vorpommerns und in einem Landkreis Brandenburgs nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden an vier Fangorten mit DOBV-infizierten Brandmäusen bei einzelnen Gelbhalsmäusen auch Spillover-Infektionen beobachtet. Die phylogenetische Analyse der kompletten Nukleokapsid- und Glykoprotein-Vorläufer-

protein-kodierenden S- und M-Segment-Sequenzen zeigte eine geographische Clusterung der Sequenzen.

Demgegenüber wurde eine breite geographische Verbreitung des Puumalavirus (PUUV) in Rötelmäusen und des Tulavirus (TULV) in *Microtus*-Mäusen dokumentiert. In den Hantavirus-Ausbruchsgebieten in Baden-Württemberg, Bayern, Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen wurde bei Rötelmäusen eine hohe PUUV-Prävalenz beobachtet. Initiale Longitudinalstudien in Nordrhein-Westfalen (Stadt Köln), Bayern (Niederbayern) und Niedersachsen (ländliche Region bei Osnabrück) zeigten ein stabiles Vorkommen des PUUV in den Rötelmaus-Populationen. Die begonnenen Longitudinalstudien werden Schlussfolgerungen zur Evolution von Hantaviren und anderen Nagetier-assoziierten Erregern und zu Veränderungen in deren Häufigkeit und Verbreitung ermöglichen. Diese Untersuchungen werden zukünftig eine verbesserte Risikoabschätzung für die Gefährdung der Bevölkerung ermöglichen, die auch die möglichen zukünftigen Klimawandel-bedingten Veränderungen in der Epidemiologie Nagetier-assoziiierter Zoonoseerreger berücksichtigt.

Die im Rahmen des Netzwerkes gesammelten Kleinsäugerproben führten auch zur Identifikation eines neuartigen Hepatitis E-Virus-ähnlichen Virus bei der Wanderratte (*Rattus norvegicus*). Des Weiteren liegen erste Daten zum Vorkommen von Infektionen mit Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, Kuhpockenvirus, Borrelien, Coxiellen und Leptospiren bei Kleinsäufern vor.

JOHNE *et al.* (2010). Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 91:750-8.

SCHLEGEL *et al.* (2009). Dobrava-Belgrade virus spillover infections, Germany. *Emerg Infect Dis* 15:2017-2020.

SCHLEGEL *et al.* (2009). Longitudinal studies on Puumala virus prevalence in bank voles from two endemic regions in Germany. *Mammalian Biology* 74S:22-23.

ULRICH *et al.* (2009). Nagetiere und Nagetier-assoziierte Krankheitserreger – das Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“ stellt sich vor. *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz* 52:352-369.

ULRICH *et al.* (2009). Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“: Monitoring von Hantavirus-Infektionen in Deutschland. *Beitr Jagd- u Wildforsch* 34:229-250.

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT, IBIZ und IfE; Julius Kühn-Institut, Münster; Freie Universität Berlin; Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München; Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Oldenburg; Charité – Universitätsmedizin Berlin; Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg; Potsdam-Institut für Klimafolgenforschung; Robert Koch-Institut, Berlin; Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin; Landesforstanstalt Eberswalde; Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Weimar; Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt; Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg (alle Deutschland); Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Office Bangkok, Thailand; Universität Bern, Schweiz

Entwicklung von serologischen Testverfahren zum Nachweis von Hantavirus-Infektionen und deren Anwendung bei seroepidemiologischen Studien

Auf der Basis eines rekombinanten, in Hefezellen exprimierten Puumalavirus (PUUV)-Nukleokapsid (N)-Proteins wurden indirekte ELISA- und Western-blot-Tests zum Nachweis von PUUV-spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern in humanen Serumproben entwickelt. Die Validierung der Tests unter Verwendung von humanen Serumpanels aus Deutschland ergab eine diagnostische Sensitivität und Spezifität von 98 %/100 % für den IgM-ELISA, 99 %/99 % für den IgG-ELISA, 99 %/100 % für den IgM-Immunoblot-Test und 100 %/96 % für den IgG-Immunoblot-Test. Diese neuentwickelten serologischen Tests wurden für eine seroepidemiologische Studie in einer Nephropathia epidemica-Ausbruchregion in Niederbayern, Südostdeutschland, eingesetzt. Dazu wurden Serumproben der Wohnbevölkerung von vier Orten (n=178) und von Soldaten an einem Ort (n=208) gesammelt. Unter Verwendung der neuentwickelten Tests wurde bei der Wohnbevölkerung eine durchschnittliche Prävalenz von 6,7 % (12 von 178) mit einer Schwankung von 0 % (0 von 21) und 11,9 % (7 von 59) ermittelt. Somit war die durchschnittliche Seroprävalenz bei der Bevölkerung der Ausbruchregion bis zu 5fach höher als die Seroprävalenz der Gesamtbevölkerung Deutschlands. Positive serologische Ergebnisse waren bei Männern und Frauen gleich verteilt mit einem Durchschnittsalter von 63 Jahren für Männer und 52 Jahren für Frauen. Die Seroprävalenz bei den Militärangehörigen betrug ca. 1 % (2 von 208).

In einer weiteren Studie wurden Proben aus Indien untersucht. Bisher gibt es keine dokumentierten klinischen Fälle von humanen Hantavirus-Infektionen aus Indien, obwohl serologische Hinweise auf das Vorkommen von Hantaviren vorliegen. Nachdem in einer ersten Studie unter Verwendung eines kommerziellen ELISA und eines indirekten Immunfluoreszenztests bei 38 von 661 Seren Hantavirus-reaktive Antikörper detektiert worden sind, wurden ausgewählte Proben im ELISA mit kompletten Nukleokapsidproteinen von PUUV und Hantaanvirus (HTNV) und mit verkürzten Nukleokapsidprotein-Derivaten von HTNV, Seoulvirus und Thailandvirus (THAIV) getestet. Die serologische Typisierung zeigte das Vorkommen von THAIV- und HTNV-verwandten Viren. Zukünftige Untersuchungen in Nagetieren und anderen Kleinsäugetieren sollen zur molekularen Identifikation der in Indien vorkommenden Hantaviren beitragen.

MERTENS *et al.* (2009). Seroepidemiological study in a Puumalavirus outbreak area in South-East Germany. *Med Microbiol Immunol* 198:83-91.

CHANDY *et al.* (2009). Hantavirus species in India: A retrospective study. *Indian J Med Microbiol* 27:348-350.

Department of Clinical Virology, Christian Medical College, Vellore, India; Institute for Animal Experimentation, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan; Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München; Friedrich-Loeffler-Institut, INNT (beide Deutschland)

1.2.6 Familie *Picornaviridae*

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

1.2.6.1 APHTOVIREN

Zu dieser Gattung zählt das Virus der **Maul- und Klauenseuche (MKS)**. Dabei handelt es sich um eine fieberhafte Allgemeinerkrankung der Klauentiere, die noch in vielen außereuropäischen Ländern, insbesondere in der Türkei sowie in Teilen Asiens, Afrikas und Südamerikas vorkommt. Die MKS führt zur Bildung von Bläschen (Aphthen) und Erosionen an kutanen Schleimhäuten und unbehaarten Teilen der Haut, insbesondere im Bereich des Mauls und der Klauen. Sie verläuft bei erwachsenen Tieren meist nicht letal, führt aber bei Rindern zu einem lang anhaltenden Leistungsabfall. Bei Jungtieren können hohe Verluste durch Schädigung des Herzmuskels auftreten. Die MKS gehört wegen ihrer potentiell katastrophalen Auswirkungen auch heute noch zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Tierseuchen. Ihre besondere Bedeutung beruht auf ihrer hohen Kontagiosität sowie auf den wirtschaftlichen Verlusten infolge der zu ihrer Bekämpfung erforderlichen drastischen Sperr- und Kontrollmaßnahmen.

Verbesserung der MKS-Diagnostik

Obwohl der MKS-Nukleinsäurenachweis mittels *real-time* RT-PCR die Virusisolierung auf Zellkultur für diagnostische Zwecke teilweise abgelöst hat, ist es auch heute noch notwendig, ein Ausbruchsvirus möglichst rasch anzuzüchten. Dies ist insbesondere erforderlich, um rasch eine Empfehlung zu ggf. einsetzbaren Impfstoffen aus der nationalen bzw. EU Vakzinebank abgeben zu können - aus den Nukleinsäuresequenzen ist der mögliche Kreuzschutz durch einen vorhandenen Impfstamm gegen ein neues MKS-Isolat bisher noch nicht befriedigend vorherzusagen. Das MKS-Virus ist zwar in frischem Aphthenmaterial in hoher Konzentration vorhanden, oft erhält das Labor aber nur älteres Material oder Proben wie Speichel oder Rachenschleim mit weit geringerem Virusgehalt. Deshalb ist eine hochsensitive Zellkultur unverzichtbar. Jedoch muss die für MKS-Virus sensitivste Zelle, die bovine Schilddrüsenzelle, jedes Mal als Primärkultur aus frischen Kälberschilddrüsen gewonnen werden, da sie nicht subkultivierbar oder auch nur gefrierlagerfähig ist. Der dazu erforderliche Aufwand und zeitliche Vorlauf sowie die Qualitätsschwankungen bei dieser primären Zelle führen

dazu, dass sie kaum in der Routine eingesetzt wird – außer am Weltreferenzlabor für MKS am Institute for Animal Health (IAH), Großbritannien. Es gelang der Zellbank des FLI und dem deutschen NRL für MKS in Zusammenarbeit mit dem IAH eine permanente Zelllinie (fetale Ziegenzungenzelle ZZ-R 127) zu etablieren und zu validieren, die den bisher verwendeten permanenten Zelllinien (z. B. BHK-21 und IB-RS-2) hinsichtlich Sensitivität und Schnelligkeit überlegen ist und nur etwa um den Faktor 3 weniger sensitiv ist als die primäre Schilddrüsenzelle. Die Zelllinie ZZ-R 127 ist für alle sieben Serotypen sensitiv und zeigt in der Regel binnen 24 Stunden einen deutlichen ZPE. Der entscheidende Grund für ihre gute diagnostische Eignung könnte die starke Expression des $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -Rezeptors sein; dies soll noch weiter untersucht werden.

BREHM *et al.* (2009). Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Clin Microbiol* 47:3156-3160.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD, IMED und IfE

1.2.7 Familie *Caliciviridae*

Die Familie *Caliciviridae* umfasst eine Reihe von unbehüllten Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom positiver Polarität und wird in die vier Gattungen *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* und *Vesivirus* unterteilt. Die isokaedrischen Kapside haben eine Größe von 35-39 nm. Wichtige tierpathogene Mitglieder der Familie sind das feline Calicivirus (FCV) und das Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche (RHDV).

Neuartiger Mechanismus der Translationsinitiation bei Caliciviren

Die Calicivirus-RNA enthält zwei bzw. drei offene Leseraster (ORF), wobei der ORF1 die Gene für die viralen Replikationsenzyme umfasst und in ein hypothetisches Polyprotein translatiert wird, das proteolytisch in die reifen Virusproteine zerlegt wird. Das Hauptkapsidprotein VP1 wird im 3' terminalen Drittel des ORF1 oder im ORF2 kodiert, das minore Kapsidprotein VP2 in einem separaten ORF am 3' Ende. Die Expression der beiden Kapsidproteine erfolgt hauptsächlich über eine prominente subgenomische RNA von ca. 2,4 Kilobasen.

Die Translation des VP2 wird durch Reinitiation der Translation nach Termination der Synthese des VP1 erreicht. Der Mechanismus, der bei Eukaryonten für eine Reinitiation der Translation sorgt, war lange ungeklärt. Bei Caliciviren konnten wir zeigen, dass ein Sequenzelement von ca. 70 bis 80 Nukleotiden am 3' Ende der VP1-kodierenden Sequenz für die VP2 Expression entscheidend ist. In dieser als TURBS bezeichneten Region befinden sich Sequenzmotive, die für die VP2 Expression essentiell sind. Der zentrale Abschnitt des sog. Motiv 1 ist bei Caliciviren konserviert. Wir konnten zei-

gen, dass diese Sequenz an eine komplementäre Region der 18 S rRNA bindet. Somit sorgt dieses Element dafür, dass das Ribosom nach Beendigung der VP1 Translation festgehalten und für die erneute Initiation am Startpunkt der VP2-kodierenden Region positioniert wird. Für diese Positionierung sind zwei weitere Motive wichtig, die eine Sekundärstruktur ausbilden, in der Motiv 1 exponiert und in einen definierten Abstand zum VP2-Startpunkt gebracht wird. Auch wenn der von uns entdeckte Mechanismus im Detail noch weiter untersucht werden muss, erlauben unsere Analysen zum ersten Mal, ein schlüssiges Modell für die Reinitiation der Translation bei Eukaryonten zu beschreiben.

LUTTERMANN, C. UND G. MEYERS (2009). The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA. *Genes Dev* 23:331-344.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfI

1.2.8 Familie *Flaviviridae*

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

1.2.8.1 PESTIVIREN

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

Untersuchungen zur Prozessierung der BVDV-Glykoproteine E^{rns} und E1

Das BVDV-Genom besteht aus einer etwa 12,3 kb großen, einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität, die für ein Polyprotein kodiert. Dieses wird ko- und posttranslational durch virale und zelluläre Proteasen in vier Struktur- und acht Nichtstrukturproteine gespalten. Der Mechanismus der Spaltung zwischen den Hüllproteinen E^{rns} und E1 ist bisher noch nicht aufgeklärt.

Im Rahmen der Studien konnte ein E^{rns} -E1-Protein in transfizierten Zellen identifiziert und mit einem E1-spezifischen Peptidserum charakterisiert werden. Das Protein hatte eine Größe von 60-65 kDa und blieb über mindestens drei Stunden stabil. Mit Hilfe von bicistronischen Konstrukten, die eine Deletion in der für E^{rns} kodierenden Genomregion trugen und E^{rns} bzw. Erns-E1 unter Kontrolle einer heterologen IRES exprimierten, konnte gezeigt werden, dass dieses Protein für die Virusreplikation nicht essentiell ist. Allerdings

hatte das Virus, welches E^{rns}-E1 exprimiert, einen deutlichen Wachstumsvorteil gegenüber dem Virus, welches E^{rns} allein exprimiert. Weiterhin wurden zwei putative Spaltstellen zwischen E^{rns} und E1 mutiert. Durch Mutation der P3 Position einer potentiellen Signalpeptid-Peptidase-Spaltstelle (A495R) in der C-terminalen Region von E^{rns} wurde die Spaltung des E^{rns}-E1-Proteins komplett verhindert und es konnten keine infektiösen Viruspartikel mehr entstehen. Die Mutation der P4-Position einer potentiellen Subtilase-Spaltstelle (R506A) in der N-terminalen Region von E1 hatte dagegen keinen Einfluss auf die Spaltung und die Entstehung infektiöser Viruspartikel. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Spaltung des E^{rns}-E1-Proteins für die Virusreplikation notwendig ist.

WEGELT *et al.* (2009) New insights into processing of bovine viral diarrhoea virus glycoproteins Erns and E1. *J Gen Virol* 90:2462-2467.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD

Konstruktion eines BVDV-2 cDNA-Volllängen-Klones und zweier Deletionsmutanten – *In-vitro*- und *In-vivo*-Charakterisierung

Mittels schrittweiser Klonierung und Ligation konnte erstmals ein infektiöser, funktioneller cDNA-Volllängenklon auf Basis des hochvirulenten BVDV-2 Stammes 890 konstruiert werden (p890FL). Nach Transfektion von Rinderzelllinien mit *in vitro* transkribierter RNA wurden infektiöse Viruspartikel gewonnen (v890FL). Diese Virionen (v890FL) zeigten keine deutlichen Unterschiede zum parentalen Isolat 890 bezüglich ihrer Wachstumseigenschaften *in vitro*. In einem vergleichenden Infektionsversuch in Rindern wurde jedoch eine geringgradige Attenuierung beobachtet. Klinische Symptome wie Fieber und Leukopenie waren nicht so ausgeprägt wie bei Tieren, welche mit dem Wildtyp-Stamm 890 infiziert worden waren. Weiterhin wurden zwei Deletionsmutanten generiert und als modifizierte Lebendvirus-Vakzine-Kandidaten gegen eine heterologe BVDV-2-Infektion geprüft. Die erste Mutante, p890ΔC, trägt eine Deletion im Strukturproteingen des Kapsidproteins, welche die Produktion von reifen infektiösen Virionen verhindert, nicht jedoch die RNA-Replikationskompetenz einschränkt. Einmal infektiöse Partikel (Pseudovirionen; v890ΔC) konnten auf Basis dieser Deletionskonstrukte mittels einer Helfer-Zelllinie gewonnen werden, die die BVDV Strukturproteine *in trans* zur Verfügung stellt. Bei der Herstellung der zweiten Mutante, v890ΔN^{pro}, wurde die Genregion, welche für die Autoprotease N^{pro} kodiert, partiell deletiert und Viren konnten auf konventionellen Zelllinien produziert werden. N^{pro} spielt eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung der unspezifischen Immunabwehr des Wirtes im Verlauf einer BVDV-Infektion. Zusammen mit einer ähnlich konstruierten BVDV-1 N^{pro} Deletionsmutante (BVDV-1ΔN^{pro}) wurden v890ΔC Pseudovirionen und v890ΔN^{pro} Virionen als neuartige modifizierte Lebendvirusvakzinen im Bezug auf ihre Sicherheit

und Wirksamkeit getestet. Rinder wurden vakziniert, darauf folgend mit einem virulenten, deutschen BVDV-2-Feldisolat (HI916) infiziert und ihre klinischen und virologischen Parameter sowohl nach der Impfung als auch nach der Infektion überwacht. Alle eingesetzten Konstrukte verminderten die Effekte der BVDV-2-Infektion deutlich, allerdings war die durch sie hervorgerufene Schutzwirkung verschieden stark ausgeprägt. Als sehr vielversprechender Ansatz für zukünftige Impfstoffentwicklungen erwies sich die partielle Deletion von N^{pro} im Klon p890FL. Die v890ΔN^{pro} Mutante induzierte eine "sterile Immunität" und somit einen vollständigen Schutz gegenüber einer heterologen Infektion. Weitere Modifikationen und Mutationen auf Genomebene des p890FL-Klones könnten detailliertere Untersuchungen einzelner Pathogenesemechanismen von virulenten BVDV-2 Stämmen ermöglichen.

ZEMKE J, KÖNIG P, MISCHKALE K, REIMANN I, BEER M. (2010). Novel BVDV-2 mutants as new candidates for modified-live vaccines. *Vet Microbiol* 142:69-80

MISCHKALE K, REIMANN I, ZEMKE J, KÖNIG P, BEER M. (2010). Characterisation of a new infectious full-length cDNA clone of BVDV genotype 2 and generation of virus mutants. *Vet Microbiol* 142:3-12

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD

Genetische Differenzierung von KSP-Feldviren und modifizierten KSP-Lebendimpfstoffen mittels *real-time* RT-PCR

Klassische Schweinepest ist eine der bedeutendsten Tierseuchen beim Haus- und Wildschwein. Um allerdings die Impfung mit Lebendimpfstoffen zu erleichtern, wurden neue Konzepte zur Differenzierung der Lebendimpfstoffe „C-Stamm Riems“ und „CP7_E2alf“ von KSP-Wildtypstämmen mittels *real-time* RT-PCR erarbeitet. Hierfür wurden spezifische Primer- und SONDENSETS sowohl für den „C-Stamm Riems“ als auch das chimäre Virus „CP7_E2alf“ entwickelt. Die PCR-Protokolle wurden mit Material aus experimentellen Immunisierungen und Infektionen, aber auch mit Feldproben geprüft und validiert. Damit stehen jetzt praxistaugliche *real-time* RT-PCR-Protokolle zur genetischen Differenzierung von geimpften und Wildtyp-infizierten Schweinen zur Verfügung.

LEIFER *et al.* (2009). Differentiation of C-strain „Riems“ or CP7_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using *real-time* RT-PCR. *J Virol Methods* 158:114-122.

LIU *et al.* (2009). Two *real-time* RT-PCR assays of classical swine fever virus, developed for the genetic differentiation of naturally infected from vaccinated wild boars. *J Virol Methods* 159:131-133.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; SVA Uppsala, Schweden; AFFSA, Paris, Frankreich.

Früher Schutz nach Immunisierung mit dem KSP-Markervakzine-Kandidaten CP7_E2alf

Aufgrund der hohen wirtschaftlichen Schäden bei Schweinepestausbrüchen ist die Möglichkeit der Notimpfung nach wie vor eine wichtige Option der Seuchenbekämpfung in der Europäischen Union. Wird allerdings mit Impfstoffen geimpft, die keine Differenzierung geimpfter von infizierten Tieren zulassen (DIVA), so ist mit erheblichen Handelsrestriktionen zu rechnen. Daher werden neue attenuierte Markerimpfstoffe dringend benötigt, um neue Bekämpfungskonzepte umsetzen zu können.

Ein vielversprechender Kandidat auf Basis einer BVDV/CSFV-Chimäre, CP7_E2alf, wurde im Rahmen einer Immunisierungs-Challenge-Studie untersucht. Hierbei wurde insbesondere der frühzeitige Eintritt einer Protektion geprüft, da dies im Rahmen von Notimpfungen von herausragender Bedeutung ist. Die Studien konnten zeigen, dass bereits sieben Tage nach intramuskulärer Applikation und vierzehn Tage nach oraler Gabe vollständiger Schutz zu beobachten war. Zudem waren auch Impfstoffverdünnungen dieses gemäß GMP produzierten Prototypen wirksam.

Somit steht derzeit mit dem CP7_E2alf-Virustamm ein vielversprechender KSP-Markerimpfstoffkandidat zur Verfügung, der auch die Anforderungen eines Notfallimpfstoffes, mit der Vermittlung einer frühen Protektion, erfüllt.

LEIFER *et al.* 2009. Modified live marker vaccine candidate CP7_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization. *Vaccine* 27:6522-9.

Friedrich-Loeffler-Institut, IVD; Fort Dodge, Spanien

1.2.9 Familie *Coronaviridae*

Untersuchung des Gewebetropismus des aviären infektiösen Bronchitis Virus mittels Immunhistochemie

Das aviäre infektiöse Bronchitis Virus (AIBV) infiziert vorrangig den Respirationstrakt empfänglicher Vögel. Manche Stämme zeigen jedoch einen variablen Tropismus und befallen z. B. auch Ovidukt, Nieren oder Drüsenmagen. Um zu prüfen, ob Immunhistochemie (IHC) für die Untersuchung des Organotropismus von AIBV in infizierten Hühnerembryonen geeignet ist, wurden zehn Tage alte Hühnerembryonen mit dem AIBV-Stamm M41 infiziert. Zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektion wurden die Embryonen und die Chorioallantoismembran (CAM) fixiert und mit Hilfe eines AIBV-spezifischen Kaninchenserums in der IHC analysiert. AIBV-Proteine wurden in der CAM und in zahlreichen Organen der Embryonen nachgewiesen. Die IHC-Ergebnisse stimmten mit parallel durchgeführten Virusreisolierungen aus den entsprechenden Organen überein. Diese Ergebnisse zeigen, dass IHC als zusätzliche Methode für die AIBV-Diagnostik und für Untersuchungen zur Pathogenese von Stämmen unterschiedlicher Virulenz eingesetzt werden kann.

ABDEL-MONEIM *et al.* (2009) Immunohistochemistry for detection of avian infectious bronchitis virus strain M41 in the proventriculus and nervous system of experimentally infected chicken embryos. *Virology J* 6:15 [Epub ahead of print; doi:10.1186/1743-422X-6-15]

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED; Virology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Beni-Suef University, Beni-Suef, Ägypten; Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasilien

2 BAKTERIEN

2.1 BAKTERIEN ALLGEMEIN

Der Einfluss von Mangan auf die Sporulation von *Bacillus* ssp. und deren Nachweis mittels Raman-Spektroskopie

In dieser Studie wurde gezeigt, dass sich anhand der Raman-Spektren von einzelnen *Bacillus*-Endosporen eruieren lässt, ob diese Endosporen während ihrer Kultivierung und anschließender Sporulation Zugang zu divalentem Mangan besaßen. In der mikrobiologischen Laborpraxis wird Mangan beispielsweise als Nährmedienzusatz verwendet, der die Endosporenbildung der in diesen Medien kultivierten Bazillen merklich forciert.

Im Wesentlichen beschränkten sich die spektralen Veränderungen auf Raman-Banden des Endosporenspezifischen Calcium-Salzes der Dipicolinsäure (CaDPA). Im Vergleich mit den Spektren von Endosporen, die auf Nährmedien ohne das Mangan-Supplement kultiviert wurden, waren die CaDPA-Banden intensitätsschwächer und erschienen teilweise verbreitert, was durch eine Überlagerung mit hinzugekommenen Signalen zu erklären war. Durch quantenchemische Berechnungen wurde die Hypothese bekräftigt, dass diese zusätzlichen Banden von Mangandipicolinat (MnDPA) stammten, welches offenbar in die Sporen neben CaDPA eingebaut wurde, sofern es dem Medium zuvor zugesetzt worden war. Auch die gemessenen Raman-Spektren der reinen Salze CaDPA und MnDPA bekräftigten diese These. Die Herkunft der Raman-Bande bei 1.030 cm^{-1} , die exklusiv in den Spektren von in Mangan-versetzten Nährmedien kultivierten Endosporen erschien, konnte ebenso nicht geklärt werden wie das Phänomen, dass in den Raman-Spektren der Art *Bacillus sphaericus* die Bande bei 1.485 cm^{-1} nur dann erschien, wenn diese zuvor auf Medien ohne Mangan-Zusatz sporulierten.

Unter Ausnutzung dieser spektralen Veränderungen konnten mit Hilfe zweier chemometrischer Verfahren (Hierarchische Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse) Endosporen anhand ihrer Raman-Spektren dahingehend klassifiziert werden, ob sie auf Medien mit oder ohne Mangan-Zusatz

kultiviert worden sind. Diese Unterscheidungsmöglichkeit kann etwa bei der Beurteilung hilfreich sein, ob zuvor im Labor in manganreichen Medien gezüchtete Endosporen in der Natur ausgebracht worden sind.

STÖCKEL *et al.* (2009). Effect of supplementary manganese on the sporulation of *Bacillus* endospores analysed by Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 40:1469-1477

Friedrich-Schiller-Universität, Institut für Physikalische Chemie, Jena; Friedrich-Loeffler Institut, IBIZ; Institut für Photonische Technologien, Jena (alle Deutschland)

2.2 BRUCELEN

VNTR-Analyse zum Nachweis von Laborinfektionen mit *Brucella* spp. beim Menschen

In den letzten Jahren wurde die Multi Locus Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analyse zur Genotypisierung von Brucellen in einigen spezialisierten Referenzlaboratorien weltweit etabliert. Im Rahmen des Projektes wurde in Zusammenarbeit mit humanmedizinischen Kliniken untersucht, ob diese Typisierungsmethode zur Überprüfung möglicher Infektketten verwendet werden kann. Dazu wurden Brucellenisolate von an Brucellose erkrankten Mitarbeitern verschiedener Laboratorien analysiert und mit den VNTR-Genotypen von Brucellen verglichen, mit denen die betroffenen Personen während des in Frage kommenden Inkubationszeitraums in Kontakt gekommen sein könnten. In mehreren Fällen konnte der identische VNTR-Genotyp bei dem Patienten bestimmt werden, der vorher im Rahmen der Labortätigkeit bearbeitet wurde, und damit eine Laborinfektion mit hoher Sicherheit nachgewiesen werden.

SCHULZE ZUR WIESCH *et al.* (2009). Genomic Tandem Repeat Analysis Proves Laboratory-Acquired Brucellosis in Veterinary (Camel) Diagnostic Laboratory in the United Arab Emirates. *Zoon Public Health* [Epub ahead of print]

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg; Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ, (alle Deutschland); Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, UAE.

2.3 BURKHOLDERIEN

Microarray-basierter Nachweis und Identifikation von *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* und anderen *Burkholderia* spp.

Das Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines diagnostischen DNA-Microarrays für die schnelle und eindeutige Identifizierung und Differenzierung der veterinärmedizinisch relevanten S3-Erreger von Rotz und Melioidose, *Burkholderia* (*B.*) *mallei* bzw. *B. pseudomallei*. Für einen einfachen und verlässlichen Einsatz in der Routinediagnostik wurde ein ‚Low-Density‘-Tube-Microarray (ArrayTube™, AT) verwendet, das ohne Probleme mit herkömmlicher Laborge-

räteausstattung verwendet werden kann und daher keine größeren Investitionskosten erfordert.

Die beiden genetisch sehr ähnlichen Erreger werden bei diesem Nachweis durch bis zu vier unabhängige genetische Marker eindeutig identifiziert und differenziert. Als Target-Regionen wurden die Gene der 16S rRNA, *fliC* und *motB*, aber auch neue Zielsequenzen verwendet, welche durch *In-silico*-Analysen identifiziert wurden. Um eine hohe Sensitivität zu erreichen, wurden diese chromosomalen Regionen durch PCR amplifiziert, markiert und PCR-Produkte hybridisiert. Die Analyse der Hybridisierungs-Signalprofile zeigte, dass das Sondensystem das Potential zur Identifizierung von zehn weiteren *Burkholderien*-Spezies bietet. Diese umfassen z. B. *B. thailandensis* oder die mit CV (zystische Fibrose) assoziierten *Burkholderien* *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria* und *B. gladioli*.

Die Validierung des Nachweisverfahrens erfolgte mit 76 repräsentativen *B. mallei*- und *B. pseudomallei*-Stämmen aus unterschiedlichen geographischen Regionen sowie 40 nicht-*Burkholderia*-Stämmen.

SCHMOOCK *et al.* (2009) DNA microarray-based detection and identification of *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia* spp. *Mol Cell Probes* 23:178-187.

Friedrich Loeffler Institut, IBIZ; CLONDIAG GmbH, Jena; Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München (alle Deutschland); Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasilien; Department of Clinical Medicine and Surgery, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

2.4 CHLAMYDIEN

Chlamydien sind obligat-intrazelluläre Prokaryoten mit einer Zellwand, die im Unterschied zu anderen Gram-negativen Bakterien kein Peptidoglycan enthält. Ihre Hülle besteht aus äußerer und innerer Membran mit einem veränderlichen periplasmatischen Raum. Ein charakteristischer Bestandteil der Außenmembran ist das Lipopolysaccharid mit einem für Chlamydien spezifischen Epitop im KDO-Trisaccharid. Daneben macht das Major Outer Membrane Protein A (MOMP) bis zu 60 % der Proteinfraction dieser Membran aus. Man unterscheidet zwei morphologische Erscheinungsformen dieser Mikroorganismen, die relativ kleinen Elementarkörper (0,2-0,6 µm Durchmesser), welche extrazellulär vorkommen, infektiös jedoch metabolisch inaktiv sind, und die größeren Retikularkörper (bis 1,5 µm Durchmesser), welche in zytoplasmatischen Einschlüssen existieren, sich dort vermehren und metabolisch aktiv sind.

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

Identifikation eines neuen infektiösen Agens im Genus *Chlamydomphila*

Drei Fälle von atypischer Pneumonie bei Beschäftigten eines Geflügelschlachthofes in Frankreich gaben den Anlass für eine gemeinsam mit dortigen Kollegen durchgeführte epidemiologische Studie in zehn Geflügelmastbetrieben, die den Schlachthof beliefert hatten. Die diagnostische Untersuchung mittels *real-time* PCR führte zum Nachweis von Chlamydien (Familie *Chlamydiaceae*) in vierzehn von 25 getesteten Beständen. Allerdings konnte nur in einem Bestand *Chlamydomphila psittaci*, der Erreger der Psittakose/Ornithose identifiziert werden. DNA-Mikroarraytests wiesen auf das Vorkommen eines neuen, bisher unklassifizierten Agens der Gattung *Chlamydomphila* in den übrigen Beständen hin.

Zur weiteren Charakterisierung wurde dieser neue Erreger aus Kloakentupfern von sechs verschiedenen Beständen in bebrüteten Hühnereiern angezüchtet. Die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens erbrachte in allen Fällen nahezu identische Sequenzen. Aus dem Alignment mit den anderen Vertretern der Familie *Chlamydiaceae* ergab sich jedoch, dass die Isolate zwar innerhalb des Genus *Chlamydomphila* eingeordnet werden können, jedoch keine ausreichende Homologie zu einer der bekannten Spezies aufweisen. Der Vergleich der partiellen *ompA*-Sequenzen zeigte darüber hinaus, dass die einzelnen Bestände mit unterschiedlichen Stämmen infiziert waren. Dieses neue chlamydiale Agens muss im Hinblick auf seine genaue taxonomische Position und das zoonotische Potential noch weiter untersucht werden.

LAROUCAU *et al.* (2009). Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infect Genet Evol* 9:1240-1247.

Bacterial Zoonoses Unit, French Food Safety Agency (AFSSA), Maisons-Alfort, Frankreich; Friedrich-Loeffler-Institut, IMP

Veränderungen im Säuren-Basen-Status von Schweinen nach experimenteller Infektion mit *Chlamydia suis*

Trotz erheblicher Unterschiede in den Interaktionen verschiedener Infektionserreger mit den tierischen Wirten während der frühen Phase der Pathogenese ist die klinische Manifestation der meisten Infektionskrankheiten durch eine zunehmende Entgleisung der wirtseigenen Homöostase gekennzeichnet. Für die bessere Analyse pathophysiologischer Vorgänge beim Schwein wurde am Beispiel der durch eine experimentelle Infektion mit *Chlamydia (C.) suis* bedingten Veränderungen ein Modell zur Beurteilung des Säuren-Basen-Status etabliert. Methodisch wurden hierfür die klassische Henderson-Hasselbalch-Gleichung mit dem neuen "simplified strong ion" Modell nach Constable verglichen, wobei letzteres erstmals für die Tierart Schwein zur Anwendung kam. Acht Schweine inhalierten ein Aerosol einer mit *C. suis* infizierten Zellkultur (Infektionsdosis: 1×10^9 Einschlusskörperchen-bildende Einheiten pro Tier), vier weitere Tiere fungierten als nicht-infizierte Kontrolltiere. Alle zwölf

Schweine wurden im Zeitraum 7 Tage *ante inoculationem* bis 8 Tage *post inoculationem* (dpi) zweimal täglich klinisch untersucht. Venöse Blutproben wurden im Abstand von zwei Tagen von jedem Tier gewonnen und einer Blutgasanalyse, Hämoximetrie, Serumelektrophorese sowie einer biochemischen Analyse von Ionen und Metaboliten unterzogen.

Die aerogene Chlamydien-Infektion der Lunge führte zu akuten, schweren respiratorischen Krankheitssymptomen. Die aerogen mit *C. suis* belasteten Tiere litten unter erheblichen Dys-Balancen im Säuren-Basen-Status. Diese waren sowohl durch eine akute respiratorische Azidose als auch durch eine sekundäre metabolische Azidose (infolge einer anaeroben Stoffwechselsituation und einer erhöhten Laktatkonzentration im Blut) bedingt. Die deutlichsten Veränderungen waren 3 dpi – und damit zeitgleich mit den ausgeprägtesten klinischen Symptomen und Lungenfunktionsstörungen – sichtbar.

Mit Hilfe dieser Studie konnten neue Informationen zur Komplexität der pathophysiologischen Interaktionen nach respiratorischer Infektion mit *C. suis* erarbeitet werden. Hierbei wurde die 'strong ion difference' (SID)-Theorie erstmals auf ihre Anwendbarkeit und diagnostische Aussagefähigkeit bei der Tierart Schwein überprüft. Sie erwies sich auch bei dieser Tierart als geeignet, um die den Störungen im Säuren-Basen-Status zugrunde liegenden unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen zu identifizieren.

REINHOLD *et al.* (2010). Characterisation of acid-base abnormalities in pigs experimentally infected with *Chlamydia suis*. *Vet J* 184:212-218

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP; Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Veterinär-Physiologie, Berlin (beide Deutschland); Purdue University, School of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Clinical Sciences, West Lafayette, IN, USA

2.5 COXIELLEN

Bei dem Erreger des Q-Fiebers, *Coxiella burnetii*, handelt es sich um ein sehr kleines, gramnegatives, obligat intrazelluläres Bakterium. Der Erreger hat ein breites Wirtsspektrum, das vor allem Säuger, Zecken und Vögel umfasst. Seine Bedeutung hat *Coxiella burnetii* insbesondere als Aborterreger bei Wiederkäuern. Besonders reichlich ist der Erreger im Fruchtwasser, in den Nachgeburten und in den Lochien enthalten. Die Übertragung erfolgt kongenital, oral oder aerogen. Ferner werden Coxiellen auch durch Zecken übertragen. Der Mensch kann ebenfalls an Q-Fieber erkranken. Besonders gefährdet sind hierbei Personen, die beruflich Kontakt mit Tieren haben wie Landwirte, Tierärzte, Schafhirten und Schafscherer sowie Schlachthofpersonal. Eine Infektion mit *Coxiella burnetii* kann zu schweren grippeähnlichen Erkrankungen, Pneumonien, Hepatitiden sowie Endocarditiden führen. Bei schwangeren Frauen kann eine Infektion mit *Coxiella burnetii* zum Abort führen.

Epizootiologie von Q-Fieber bei Wiederkäuern und wild lebenden Säugetieren und differenzierende molekulare Pathogenese von *Coxiella burnetii* bei Mensch und Tier

Im Rahmen eines BMBF-Verbundprojektes zur Förderung der Forschung auf dem Gebiet der Zoonosen werden sowohl Proben von Haustieren (Rind, Schaf, Ziege) als auch Proben von Wildtieren (Schwarzwild, Rot- und Rehwild, Bisam, Hase) aus unterschiedlichen endemischen Regionen Deutschlands untersucht. Gezielte Probennahmen bei Schaf, Rind und Ziege finden vor allem in Gebieten mit humanen Q-Fieber-Ausbrüchen oder einer bekannten regionalen Q-Fieber-Problematik in Wiederkäuerherden statt. Zur Anwendung kommen hierbei sowohl der direkte Erregernachweis (PCR, Anzucht mittels Zellkultur) als auch der indirekte Nachweis mittels ELISA und Immunoblot. Ziel der Untersuchungen ist es, die Epidemiologie von Q-Fieber und die molekulare Pathogenese von *Coxiella burnetii* bei Mensch und Tier besser zu verstehen, um so Q-Fieber-Ausbrüche effektiver bekämpfen bzw. vermeiden zu können.

HENNING *et al.* (2009). Unanticipated outbreak of Q fever during a study using sheep, and its significance for further projects. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:13-19.

KITTELBERGER *et al.* (2009). Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants: Recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *New Zealand Vet J* 57:262-268.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE und IBIZ; Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Arnsberg; BGFA-Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum; Universitätsklinikum Essen; CVUA Stuttgart, Fellbach (alle Deutschland); Ministry of Agriculture & Forestry, Investigation & Diagnostic Centre, Wallaceville, New Zealand; Animal Health Service, Dept. Diag. Res. & Epid., Deventer, The Netherlands; VLA, Surrey, UK; Trop & Aquat Anim Hlth Lab, Biosecurity Queensland, Townsville, Australia; MAF Biosecur New Zealand, Wellington

2.6 ESCHERICHIA COLI

Analyse des klonalen Zusammenhangs von Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) des Serotyps O26:H11 isoliert aus Rindern

Über einen Zeitraum von 15 Monaten wurden drei Rinderhaltende Betriebe auf das Auftreten von Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) des Serotyps O26:H11 untersucht. Die gefundenen 57 O26 Isolate (56 O26:H11, ein O26:H32) wurden hinsichtlich des Vorhandenseins EHEC-typischer Virulenzmarker charakterisiert und somit ihr mögliches Gefährdungspotential für den Menschen abgeschätzt. Andere Autoren hatten in Multilocus sequence typing (MLST) Untersuchungen gezeigt, dass EHEC-O26:H11-Isolate in bis zu vier verschiedene Sequenztypen (STs) eingeordnet werden können, die aber alle dem Klonkomplex 29 zuzuordnen sind.

Die mit dieser Methode von uns untersuchten fünf O26:H11-Isolate, die aus verschiedenen Betrieben und unterschiedlichen Clustern stammten, konnten in zwei Sequenztypen (ST 21 und ST 396) eingeordnet werden. Dabei wurden die Isolate aus den Betrieben A und C als ST 21 charakterisiert, dem bisher am häufigsten bei Menschen und Tieren gefundenen Sequenztyp von EHEC O26:H11. Dem ST 396 wurde das einzelne Isolat aus Betrieb D zugeordnet. In allen O26:H11-Isolaten wurden *stx1* Gene kombiniert mit *ae-*, *tir-*, *espA-* und *espB-* Genen nachgewiesen, wobei die *ae-*, *tir-*, *espA-* and *espB-* Gene jeweils in die Subgruppen eingeordnet werden konnten. Zusätzlich fanden wir in zwölf O26:H11-Isolaten *stx2*-Gene. Weitere Virulenz-assoziierte Marker (*hlyA*-Gen, *katP*-Gene, *espP*-Gen, *efa*-Gen) konnten wir in den meisten O26:H11-Isolaten nachweisen. Mittels DNA-Sequenzierung wurden die A- und B-Subunits der *stx1*- und *stx2*-Gene eines der O26:H11-Isolate charakterisiert. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen waren identisch bzw. nahezu identisch mit den Nukleotidsequenzen korrespondierender *stx*-Gene von EHEC-O26:H11- und EHEC-O157:H7/H-Stämmen, die mit Fällen des Hämolytisch-Urämischen Syndroms (HUS) beim Menschen bzw. anderen humanen EHEC-Infektionen weltweit in Zusammenhang gebracht wurden. Die klonalen Zusammenhänge zwischen allen O26-Isolaten in Zeit und Raum wurden durch Clusteranalyse untersucht. Dabei fanden wir zwölf verschiedene Clustergruppen. Deutlich unterschiedlich clusterten die Isolate aus den drei verschiedenen Betrieben, aber auch innerhalb der einzelnen Betriebe konnten differente Cluster nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Clusteranalyse lassen vermuten, dass nur einige EHEC-O26:H11-Stämme das genetische Potential besitzen, um über einen längeren Zeitraum im Rind bzw. im Betrieb zu persistieren. Andere O26:H11-Stämme scheinen dieses Potential nicht zu besitzen. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die aus Rindern isolierten O26:H11-Stämme ein erhebliches Gesundheitsrisiko für den Verbraucher darstellen.

GEUE *et al.* (2009). Analysis of the Clonal Relationship of Serotype O26:H11 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Isolates from Cattle. *Appl Environ Microbiol* 75:6947-6953.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Institut für Mathematik und Informatik (beide Deutschland)

2.7 MYKOBAKTERIEN

Mykobakterien sind obligat aerobe, grampositive und unbewegliche Stäbchen. Die komplexe, lipidreiche Zellwand schützt diese Bakterien gegen Austrocknung, extreme pH-Werte und andere umweltbedingte Stressoren.

2.7.1 Paratuberkulose

Der Erreger der Paratuberkulose (paraTB), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) kommt in vielen Ländern bei Rind, Schaf und Ziege endemisch vor. Die Aufklärung möglicher Übertragungswege zwischen Hauswiederkäuern, jedoch auch zwischen Haus- und Wildwiederkäuern ist für die Erarbeitung effektiver Bekämpfungsstrategien unverzichtbar. Die Rolle von MAP in der Ätiologie des Morbus Crohn (MC), einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung des Menschen, wird seit der Erstbeschreibung des MC im Jahr 1913 kontrovers diskutiert. Die Aufklärung des zoonotischen Potentials des Erregers ist nur in Modellsystemen, z. B. in Zellkulturmodellen, möglich.

Vorkommen verschiedener Rinderstämme der Spezies *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in Deutschland – Charakterisierung von seltenen intermediären MAP-Isolaten aus Wanderschafherden

MAP, ein extrem langsam wachsender Organismus, besitzt eine sehr geringe genetische Heterogenität. Zwei Genotypen werden innerhalb dieser Subspezies unterschieden. Typ I kommt vor allem bei Schafen vor („Schaf-Typ“), Typ II wurde vor allem bei Rindern, jedoch auch bei Schafen, Ziegen, Hirschen u. a. Spezies nachgewiesen („Rinder-Typ“). Die Existenz eines Typ III („intermediärer Typ“) wird diskutiert. Um Übertragungswege von MAP zwischen einzelnen Tieren, Herden bzw. verschiedenen Wirtsspezies verfolgen zu können, müssen Isolate über diese Einteilung hinaus feiner differenziert werden können. Deshalb wurden Isolate unterschiedlicher Herkunft aus Deutschland mit mehreren molekularen Typisierungstechniken – basierend auf verschiedenen Zielregionen im Genom – charakterisiert. Dazu gehörten die IS900-RFLP, die MIRU-VNTR-Typisierung und die MLSSR-Sequenzanalyse. Durch eine Kombination der Methoden wurde eine für epidemiologische Untersuchungen ausreichend hohe Diskriminierungskraft erreicht. Alle Rinder-, Rotwild-, zwei Ziegen- und einige Schafisolatate gehörten dem am häufigsten vorkommenden MAP-Typ II an und zeigten bei Kombination der drei Methoden eine Vielfalt an Genomprofilen. Durch diesen Ansatz konnten epidemiologische Verknüpfungen zwischen verschiedenen Wirtsspezies innerhalb einer geographischen Region nachgewiesen werden.

Aus zwei Wanderschafherden wurden erstmalig für Deutschland zwei MAP-Typ III-Stämme isoliert. Derartige Stämme wurden bisher weltweit nur in wenigen Studien beschrieben. Beide Stämme zeigten andere Wachstumseigenschaften als MAP-Typ I- und II-Stämme, bisher nicht bekannte intermediäre IS900-RFLP-Muster und individuelle MIRU-VNTR- und MLSSR-Profile. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme des Vorkommens einer separaten MAP-Typ III-Gruppe. Untersuchungen zur Verwandtschaft der MAP-Gruppen ergaben konservierte IS1311-Sequenzen und Verteilungsmuster von verschiedenen *Large Sequence Poly-*

morphisms (LSPs) bei MAP-Typ I- und III-Isolaten, die sich jedoch von Typ II-Isolaten unterscheiden. Durch diese Untersuchungen wurde erstmals deutlich, dass zwischen Typ I- und III-Stämmen eine engere Verwandtschaft besteht als zu MAP-Typ II-Stämmen.

Möbius et al. (2009) Unique genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains of Type III. *Vet Microbiol* 139:398-404.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP und IBIZ; Arbeitsgemeinschaft Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper, Krefeld (alle Deutschland)

2.8 MYKOPLASMEN

Der *Mycoplasma mycoides*-Cluster besteht aus sechs für Wiederkäuer pathogenen Mykoplasmen. *Mycoplasma* (*M.*) *mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (MmmSC) ist der Erreger der Lungenseuche des Rindes, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp) der Erreger der kontagiösen Pleuropneumonie der Ziege. Beide Erkrankungen sind anzeigepflichtig entsprechend der OIE-Liste. Weitere Mitglieder des Clusters sind *M. mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony (MmmLC), *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc) und *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc) als Erreger von Mastitis, Arthritis, Keratokonjunktivitis, Pneumonie und Septikämie in kleinen Wiederkäuern. Außerdem sind in diesem Zusammenhang noch die Stämme von *Mycoplasma* spp. bovine group 7 (MBG7) nach Leach zu erwähnen, die mit Mastitis und Polyarthritiden im Rind assoziiert werden, jedoch bislang keinen endgültigen taxonomischen Status gefunden haben. Umfangreiche genotypische und phänotypische Gemeinsamkeiten zwischen Mykoplasmen-Spezies verursachen in der Diagnostik und Epidemiologie zahlreiche Probleme.

Vorschlag für eine neue Taxonomie des *Mycoplasma mycoides*-Clusters

Nach kritischer Analyse aller zur Verfügung stehenden Daten über Phänotyp, biochemische Eigenschaften und der kürzlich durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen an mehreren genomischen Loci wird vorgeschlagen, die Taxonomie des Clusters zu überholen. So besitzen i) die MBG7-Stämme genügend gemeinsame Charakteristika, um eine eigene separate Spezies, *Mycoplasma leachii* sp. nov., zu bilden. Da ii) MmmLC und Mmc genetisch nahe verwandt bis identisch und nur serologisch zu unterscheiden sind, ihre Verwandtschaft zu MmmSC aber nur weitläufig ist, sollten sie in einer Spezies, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, vereinigt werden. Damit verbleibt *M. mycoides* subsp. *mycoides* (MmmSC) als einziges Taxon in seiner Subspezies. Die Studie liefert genaue taxonomische Beschreibungen aller genannten Einheiten. Somit würde der *Mycoplasma mycoides*-Cluster jetzt aus fünf Taxa mit den Subclustern von *M. mycoides*, *M. capricolum* und der neuen Spezies *M. leachii* bestehen.

MANSO-SILVÁN *et al.* (2009). *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1353-135.

CIRAD, UMR 15 Control of exotic and emerging animal diseases, Montpellier, Frankreich; Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, Vetsuisse Faculty, Bern, Schweiz; Friedrich-Loeffler-Institut, IMP; NSW Department of Primary Industries, Elizabeth Macarthur Agricultural Institute, Camden, NSW, Australien

2.9 SALMONELLEN

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

Epidemiologie von *Salmonella Choleraesuis* bei Wildschweinen in Thüringen

Die an das Schwein adaptierte Serovar *Salmonella Choleraesuis* wird in westeuropäischen Ländern einschließlich Deutschland nur sehr selten nachgewiesen. Im Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz wurde jedoch zwischen 2006 und 2008 bei der routinemäßigen Untersuchung von Wildschweinen nur die Serovar *Salmonella Choleraesuis* bei insgesamt 24 Tieren nachgewiesen. Bei Hausschweinen wurde diese Serovar in drei Fällen isoliert. Alle 27 *Salmonella-Choleraesuis*-Isolate wurden mittels Plasmidprofilanalyse, Makrorestriktionsanalyse, REP-PCR, ERIC-PCR, biochemischem Reaktionsmuster sowie durch das Antibiotika-Resistenzprofil näher charakterisiert, um mögliche epidemiologische Zusammenhänge nachzuweisen. Die Kombination aller Methoden ermöglichte die Identifizierung von insgesamt fünf epidemiologischen Gruppen von *Salmonella Choleraesuis*. Zwei Gruppen wurden in der gleichen Region nachgewiesen, drei andere epidemiologische Gruppen von *Salmonella Choleraesuis* waren jedoch jede für sich in einem anderen Gebiet vorhanden. Es konnte gezeigt werden, dass jede epidemiologische Gruppe von *Salmonella Choleraesuis* in der Wildschweinpopulation der entsprechenden Region zirkuliert. Darüber hinaus konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass sowohl natürliche Barrieren wie Gebirge als auch künstliche Hindernisse wie Autobahnen eine Trennung der Wildschweinpopulationen und demzufolge auch der unterschiedlichen epidemiologischen Gruppen von *Salmonella Choleraesuis* verursachen. Das Vorkommen der gleichen epidemiologischen Gruppen

von *Salmonella Choleraesuis* bei Wild- und Hausschweinen weist auf die Möglichkeit der gegenseitigen Übertragung des Erregers hin. Um das Risiko einer Übertragung von *Salmonella Choleraesuis* von Wildschweinen auf Hausschweine oder den Menschen zu reduzieren, sollten die routinemäßige veterinärmedizinische Untersuchung von Wildfleisch und die regelmäßige Belehrung von Jägern und anderen Personen, die Wildfleisch verarbeiten, in hoher Qualität durchgeführt werden.

METHNER *et al.* (2009). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* in a wild boar population in Germany. *Eur J Wildl Res* [Epub ahead of print; doi:10.1007/s10344-009-0339-3].

Friedrich-Loeffler-Institut, IBIZ; Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Bad Langensalza (beide Deutschland)

Untersuchungen zur zökalen extrazellulären Matrix und Virulenzgenexpression nach *Salmonella*-Infektion

Für eine *Salmonella* (S.)-Adhäsion an und die Invasion in das intestinale Gewebe scheinen Interaktionen von Strukturen der äußeren Membran der Bakterien mit der extrazellulären Matrix (ECM) des Wirtsgewebes entscheidend zu sein. Um die Bedeutung der ECM für die S.-Invasion in die Darmwand zu untersuchen, wurden die Reorganisation von Fibronectin, Tenascin-C und Laminin nach S.-Belastung von Eintagsküken, die S.-Adhäsion an ECM-Proteine *in vitro* und die Virulenzgenexpression nach Co-Kultivierung von Salmonellen und ECM-Proteinen getestet. Für diese Untersuchungen wurden die unterschiedlich invasiven S.-Serovaren Enteritidis (SE) und Infantis (SINF) genutzt.

Mikrokolonien des hoch invasiven SE, nicht jedoch von SINF, fanden sich eingebettet und in engem Kontakt zum reorganisierten Fibronectin- und Tenascin C-Netzwerk im Darm der infizierten Tiere. Allerdings konnte keine Deposition von ECM-Proteinen auf die epitheliale Oberfläche beobachtet werden. Stattdessen wurde eine räumliche Assoziation von SE mit den Netzwerkstrukturen von ED_A(*extra domain A*)⁺-Fibronectin und Tenascin-C in der Lamina propria festgestellt. Zusätzlich besitzt SE im Vergleich zu SINF eine erhöhte Kapazität an ECM-beschichtete Oberflächen zu adhären. Diese Fähigkeiten könnten SE zur schnelleren und besseren Ausbreitung in der Lamina propria dienen.

Um zu untersuchen, inwieweit eine Interaktion der Bakterien mit der ECM die Ausprägung verschiedener Virulenzfaktoren beeinflusst, wurde erstmalig eine Virulenzgenexpressions-Analyse nach Kontakt von SE und SINF mit zellulärem Fibronectin, Laminin und Matrigel™ (Matrixprotein der Basalmembran) durchgeführt. Dazu wurde ein Microarray-basiertes Testsystem mit insgesamt 46 unterschiedlichen Genen entwickelt. Darunter befinden sich auch solche Gene, die für die Ausbreitung der Pathogene im Gewebe notwendig sind. Die Anwesenheit von Komponenten der ECM im Kulturmedium der Bakterien modifizierte die Transkription einer Vielzahl der untersuchten Virulenzgene beider Sero-

varen, was auf eine Signalübertragung in die Bakterienzelle hindeutet. Allerdings waren die Expressionsraten der meisten untersuchten Gene insgesamt eher gering. Lediglich das Motilitäts-assoziierte Gen *fliC* zeigte nach Kontakt von SE, nicht aber von SINP, mit Laminin, Fibronectin und Tenascin-C eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression. Dies konnte durch quantitative *real-time* RT-PCR-Analyse bestätigt werden. Dass *fliC* eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Invasion in Epithelzellen sowie bei der Kolonisation von Salmonellen im aviären Darm spielen kann, ist von anderen Autoren bereits gezeigt worden. Neben der bakteriellen Motilität dient die auf der bakteriellen Oberfläche in großen Mengen ausgeprägte Flagella-Untereinheit *fliC* als Ligand für den Toll-*like*-Rezeptor-5 und stellt damit ein wichtiges Molekül für die Auslösung pro-inflammatorischer Reaktionen dar. Die hier ermittelten Microarray-basierten Daten zeigen, dass auch die Serovar-spezifische Induktion der *fliC*-Expression durch extrazelluläre Matrixproteine zur relativ starken Invasivität und Immunogenität des Serovars Enteritidis beitragen könnte.

BERNDT *et al.* (2009). Reorganisation of the caecal extracellular matrix upon *Salmonella* infection – Relation between bacterial invasiveness and expression of virulence genes. *Vet Microbiol* 133:123-137.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP und IBIZ; HELIOS-Klinikum, Institut für Pathologie, Erfurt; Friedrich-Schiller-Universität, Institut für Pathologie, Jena, (alle Deutschland); Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genua, Italien

2.10 BIOMARKER ZUR ERKENNUNG VON INFEKTIONEN

Flüchtige organische Substanzen als potentielle Biomarker zur Infektionsdiagnostik

Die Anwendung so genannter elektronischer Nasen ist bisher aus der Medizin, der Sicherheitsüberwachung und der Lebensmittelindustrie bekannt. Ob diese Technologie auch zur frühzeitigen Erkennung von Infektionen oder Erkrankungen bei Tieren genutzt werden kann, ist bislang kaum untersucht. Als Hypothese wird zugrunde gelegt, dass bei verschiedenen Krankheiten unterschiedliche Muster an flüchtigen organischen Substanzen (volatile organic compounds, VOC) im Wirtstier generiert werden, deren Muster zur Krankheitserkennung nutzbar sind. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden zwei Studien an Rindern mit unterschiedlichem Infektionsstatus durchgeführt, wobei die VOC-Analyse mittels elektronischer Nase („e nose“, ST214, Scensive Tech. Ltd., Leeds, UK) in den Gasphasen über den Blutserumproben der Tiere erfolgte.

Studie I (Modell einer experimentellen Infektion):

Serumproben von 20 Kälbern, entnommen vor und nach

intratrachealer Inokulation des gram-negativen Bakteriums *Mannheimia haemolytica* A1, wurden einer Konzentrationsbestimmung von Akute-Phase-Proteinen (APP) unterzogen. In der Gasphase über dem Serum erfolgte eine VOC-Analyse mittels „e-nose“. Signifikante Veränderungen in den Signalen bestimmter „e-nose“-Sensoren zeigten, dass sich die VOC-Muster der Proben ante und post *infectionem* unterschieden. Die maximale Reaktion der sensitiven „e-nose“-Sensoren trat zum Höhepunkt der klinischen Erkrankung auf. Steigende APP-Konzentrationen im Blut der Tiere korrelierten signifikant mit abnehmenden Reaktionen mehrerer „e-nose“-Sensoren. Offensichtlich ist die elektronische Nase tatsächlich in der Lage, zwischen dem Zustand ‚infiziert‘ und ‚nicht-infiziert‘ zu unterscheiden, wobei das VOC-Muster, welches den „e-nose“-Reaktionen zugrunde liegt, mit der Akuten-Phase-Reaktion des Wirtstieres korreliert.

Studie II (natürliche Infektionen):

Für diesen Teil der Untersuchung wurden 117 Blutserumproben von Rindern aus britischen und deutschen Herden verwendet, wobei die Einzeltiere mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ParaTB, n=43) oder *Brucella* sp. (n=26) infiziert waren bzw. als Kontrolltiere (n=48) fungierten. In einem randomisierten und verblindeten Studiendesign wurden mit der „e-nose“ die Gasphasen über allen Serumproben analysiert. Auf Gruppenniveau war es möglich, die Seren der Brucellose-infizierten, der ParaTB-infizierten und der gesunden Tiere voneinander zu unterscheiden. Allerdings war es mit dem in dieser Studie eingesetzten „e-nose“-Typ nicht möglich, den Status des Einzeltieres sicher festzustellen.

Die Ergebnisse beider Studien machen deutlich, dass die Analyse flüchtiger organischer Substanzen in biologischen Proben mittels geeigneter Technologie ein Potential zur Erkennung von Infektionen bzw. Erkrankungen besitzt.

KNOBLOCH *et al.* (2010). Electronic nose responses and acute phase proteins correlate in blood using a bovine model of respiratory infection. *Sensor Actuator B Chem* 144:81-87.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMP; Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Institut für Bakteriologie und Mykologie, Leipzig (beide Deutschland); Cranfield Health at Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire; The Open University, Department of Chemistry and Analytical Science, Milton Keynes; Veterinary Laboratories Agency (VLA), Department of Statutory and Exotic Bacterial Diseases, Weybridge, Addlestone Surrey (alle UK)

2.11 BAKTERIELLE RESISTENZFORSCHUNG

Antimikrobielle Wirkstoffe stellen in der Veterinärmedizin unverzichtbare Hilfsmittel bei der Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten dar. Die Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe birgt jedoch die Gefahr, dass die zu bekämp-

fenden Erreger, aber auch Kommensalen unter dem Selektionsdruck Resistenzen gegenüber den entsprechenden Wirkstoffen entwickeln bzw. erwerben. Für viele bakterielle Erreger aus dem veterinärmedizinischen Bereich liegen bislang nur unzureichende Informationen über die genetischen Grundlagen und die Übertragbarkeit entsprechender Resistenzeigenschaften vor. Die nachfolgend beschriebenen publizierten Projekte zu unterschiedlichen Aspekten der antimikrobiellen Resistenz bei Bakterien von Lebensmittel liefernden Nutztieren, Kleintieren, aber auch Fischen dienen dazu, entsprechende Wissenslücken zu füllen.

Identifizierung eines neuen Trimethoprim-Resistenzgens, *dfrK*, bei einem porzinen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398-Stamm

In dieser Studie wurde ein Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stamm aus der BfT-GermVet-Monitoringstudie untersucht. Das porzine MRSA-Isolat des Multilocus-Sequenztyps 398 war zusätzlich zur β -Laktamresistenz resistent gegenüber Tetrazyklinen und Trimethoprim. Die Tetrazyklin-Resistenzgene *tet(M)* und *tet(L)* wurden nachgewiesen. Keines der bisher bei Staphylokokken bekannten Trimethoprim-Resistenzgene konnte detektiert werden. Plasmide wurden isoliert und mittels Protoplastentransformation in *S. aureus* RN4220 transformiert. Der Transformant zeigte Resistenz gegenüber Tetrazyklin und Trimethoprim und wies das Gen *tet(L)* auf. Das transformierte Plasmid pKKS2187 von ca. 40 kb wurde mithilfe von Restriktionsenzymen verdaut und die *HindIII*- und *BglII*-Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Bei den Sequenzanalysen wurde ein neues Trimethoprim-Resistenzgen, das als *dfrK* bezeichnet wurde, identifiziert. Das Gen lag 283 bp stromabwärts von *tet(L)*. Die Gensequenz wies 86 % Identität zu *dfrG* von *S. aureus* SAV0404 auf und kodierte für ein 164 Aminosäuren großes Protein mit 90 % Identität zum 165 Aminosäuren großen DfrG-Protein. Die flankierenden Regionen (ca. 300 bp stromaufwärts und ca. 600 bp stromabwärts von *dfrK*) zeigten keine Homologie zu Sequenzen aus der Datenbank. Im Gegensatz dazu wies die Genregion um diesen *dfrK*-tragenden Bereich und um das *tet(L)*-Gen > 99 % Homologie zum *tet(L)*-tragenden Plasmid pBC16 auf. Dieser Bereich, der die Resistenzgene *dfrK* und *tet(L)* umfasste, wurde von Insertionssequenzen des Typs IS257 flankiert. Die Co-Lokalisation von *dfrK* und *tet(L)* auf demselben Plasmid führt zur Erhaltung solch eines Plasmids und beider Resistenzgene unter dem Selektionsdruck durch die Anwendung von entweder Tetrazyklinen oder Trimethoprim.

KADLEC, K. UND S. SCHWARZ (2009). Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:776-778.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Ein neuer ABC-Transporter, *Vga(C)*, identifiziert in einem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* ST398-Stamm, exportiert Streptogramin A-Antibiotika, Linkosamide und Pleuromutiline

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme zeigen häufig zusätzlich zur β -Laktamresistenz auch Resistenz gegenüber anderen Wirkstoffen. Pleuromutilinresistenz wird allerdings sehr selten beobachtet. In dieser Studie wurde das Multiresistenzplasmid pKKS825 aus einem porzinen MRSA ST398-Stamm analysiert, welches auch Pleuromutilinresistenz vermittelte. Das Plasmid wurde mittels Protoplastentransformation in *S. aureus* RN4220 transformiert und vollständig sequenziert. Das Plasmid war 14.364 bp groß und trug drei bereits bekannte Resistenzgene: das Trimethoprim-Resistenzgen *dfrK*, das Tetrazyklin-Resistenzgen *tet(L)* und das Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen *aadD*. Diese drei Resistenzgene waren in einem ähnlichen *tet(L)/dfrK*-Gencluster organisiert wie bei Plasmid pKKS2187 beschrieben. Auf dem Plasmid pKKS825 befand sich ein viertes Resistenzgen, das die Bezeichnung *vga(C)* erhielt. Dieses Gen kodierte für einen ABC-Transporter von 523 Aminosäuren (AS). Das *Vga(C)*-Protein wies typische Merkmale eines Klasse 2-ABC-Transporters auf und zeigte die größte Ähnlichkeit zu *Vga(A)*-Varianten von Staphylokokken (62,3 - 65,5 % AS-Identität). Es hatte lediglich 39,2 % AS-Identität zu *Vga(B)*. Über die vergleichende Bestimmung von minimalen Hemmkonzentrationen des Empfängerstammes *S. aureus* RN4220 und des entsprechenden pKKS825-Transformanten konnte gezeigt werden, dass das neue *vga(C)*-Gen Resistenz gegenüber Streptogramin A-Antibiotika (Virginiamycin M1), Linkosamiden (Clindamycin, Lincomycin, Pirlimycin) und Pleuromutilinen (Tiamulin, Valnemulin) vermittelte. Die Co-Lokalisation des *vga(C)*-Gens auf einem Plasmid, welches auch die Resistenzgene *aadD*, *tet(L)* und *dfrK* beherbergte, kann zur Verbreitung und Persistenz solch eines Plasmids führen, sofern ein Selektionsdruck durch die Anwendung von Kanamycin, Neomycin, Tetrazyklinen, Trimethoprim, Linkosamiden, Pleuromutilinen oder Streptogramin A-Antibiotika besteht.

KADLEC, K. UND S. SCHWARZ (2009). Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3589-3591.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Untersuchungen zur Vielfalt antimikrobieller Resistenzphäno- und -genotypen bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398-Stämmen von erkrankten Schweinen

Insgesamt 54 MRSA ST398-Stämme von erkrankten Schweinen aus Deutschland wurden in dieser Studie hinsichtlich ihrer genetischen Verwandtschaft, ihrer antimikrobiellen Resistenz und ihrer Virulenzeigenschaften untersucht. Hierzu wurden minimale Hemmkonzentrationen für 30 an-

antimikrobielle Wirkstoffe mittels Bouillon-Mikrodilution bestimmt. Resistenz- und Virulenzgene wurden über einen diagnostischen Microarray oder spezifische PCRs identifiziert. Alle Stämme wurden mittels PCR-gerichteter SCC*mec*-Typisierung, *Apal*- und *Smal*-Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und *spa*-Typisierung untersucht. Die Empfindlichkeitsprüfung zeigte, dass alle 54 Stämme Tetrazyklin-resistent waren und über die Resistenzgene *tet*(M) + *tet*(K) (n=40), *tet*(M) + *tet*(K) + *tet*(L) (n=11), *tet*(M) (n=1), *tet*(L) (n=1) oder *tet*(M) + *tet*(L) (n=1) verfügten. Von den 28 Trimethoprim-resistenten Stämmen besaßen vierzehn Stämme das Gen *dfcK* und weitere neun Stämme das Gen *dfcG*. Makrolid /Linkosamidresistenz basierte auf den Genen *erm*(A) (n=4), *erm*(B) (n=6), und *erm*(C) (n=12), *erm*(A) + *erm*(B) (n=1), *erm*(A) + *erm*(C) (n=1) und *erm*(T) (n=1). Das Gen *fexA* war bei beiden Chloramphenicol/Florfenicol-resistenten Stämmen nachweisbar. Alle acht Gentamicin-resistenten Stämme verfügten über das Gen *aacA/aphD*. Insgesamt 53 Stämme besaßen ein SCC*mec*-Element vom Typ V, während bei dem verbleibenden Stamm keines der bekannten *ccr* Rekombinasegene nachweisbar war. Alle Stämme waren positiv für die Hämolysin α - und δ -Gene, aber negativ für die Virulenzgene *lukF-PV* und *lukS-PV*, *tst* sowie Gene für exfoliative Toxine. Ein Stamm bzw. drei Stämme waren positiv für das Enterotoxin B-Gen (*seb*) bzw. die Enterotoxin K- und Q-Gene (*sek* + *seq*). Acht unterschiedliche *spa*-Typen wurden identifiziert, wobei t011 (n=39) den dominanten *spa*-Typ darstellte. Alle 54 Stämme erwiesen sich als nicht-typisierbar in der *Smal*-PFGE, zeigten aber sechs klar unterscheidbare Hauptmuster in der *Apal*-PFGE. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass die untersuchten MRSA ST398-Stämme nur geringfügig in ihren Virulenzeigenschaften und *spa*-Typen variierten, dagegen aber deutliche Unterschiede in ihren antimikrobiellen Resistenzphäno- und Resistenzgenotypen wie auch in ihren *Apal*-PFGE Fragmentmustern zeigten. Diese Daten unterstreichen die Fähigkeit von MRSA ST398-Stämmen, genetisches Fremdmaterial aufzunehmen, das zu einer Steigerung der Resistenz- und Virulenzeigenschaften der Stämme beitragen kann.

KADLEC *et al.* (2009). Diversity of antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother* 64:1156-1164.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; CLONDIAG GmbH, Jena; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Technische Universität, Dresden; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Berlin (alle Deutschland)

Nachweis des Multiresistenzgens *cfr* bei Methicillin-resistenten und Methicillin-empfindlichen *Staphylococcus aureus*-Stämmen der klonalen Linien ST398 und ST9 von Schweinen

Das Gen *cfr* wurde erstmalig bei Staphylokokken von Tieren nachgewiesen und vermittelt Resistenz gegenüber Pheni-

colen, Linkosamiden, Oxazolidinonen, Pleuromutilinen und Streptogramin A-Antibiotika. Ziel dieser Studie war es, Informationen zur Verbreitung des Multiresistenzgens *cfr* bei Staphylokokken von Schweinen zu erarbeiten. In diese Studie wurden insgesamt 256 porcine Staphylokokken aus Testkollektiven des Robert Koch-Instituts (RKI) und des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) einbezogen. Zwei *cfr*-positive Isolate wurden identifiziert. Hierbei handelte es sich um einen Methicillin-empfindlichen *S. aureus*-Stamm (ST9, *spa*-Typ t3198) aus dem RKI-Testkollektiv und einen Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stamm (ST398, *spa*-Typ t034) aus dem FLI-Testkollektiv. In beiden Fällen wurde das *cfr*-Gen auf einem Plasmid vom Typ pSCFS3 nachgewiesen, bei dem das *cfr*-Gen integriert in ein *fexA*-tragendes Transposon vom Typ Tn558 vorliegt. Der Nachweis des *cfr*-Gens auf strukturell eng verwandten Plasmiden in Stämmen unterschiedlicher klonaler Linien deutet auf eine horizontale Verbreitung hin, die auch *S. aureus*-Stämme vom Menschen – und hierbei insbesondere Menschen mit Kontakt zu Schweinen – einschließen kann.

KEHRENBURG *et al.* (2009). Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:779-781.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Robert Koch-Institut, Wernigerode (beide Deutschland)

Verminderte Fluorchinolon-Empfindlichkeit bei Mutanten verschiedener Non-Typhimurium *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovare durch mutationsbedingte Änderungen in der Expression der Gene *ramA* und *soxS*

Fünf Feldisolate und isogene Mutanten verschiedener *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovare, bei denen in einer früheren Studie zur Bestimmung der Mutationspräventionskonzentration eine verstärkte Effluxaktivität via AcrAB feststellbar war, wurden vergleichend hinsichtlich struktureller Veränderungen in den Regulatorregionen für das AcrAB-TolC System untersucht. Hierzu wurden zunächst MHK-Werte für die zum Substratspektrum des AcrAB-TolC Systems gehörigen antimikrobiellen Wirkstoffe bestimmt. Anschließend wurden die Regulatorgene *acrRA*, *soxRS*, *marORAB*, *acrSE* und *ramRA* der Feldisolate und der dazugehörigen Mutanten sequenziert und miteinander verglichen. Die Expression der Gene *acrA*, *tolC*, *ramA* und *soxS* wurde mittels quantitativer *real-time* RT-PCR untersucht. In vier Mutanten wurden Veränderungen in der *ramRA* Regulatorregion, die mit einer erhöhten Expression von *ramA* einhergingen, nachgewiesen. Diese Veränderungen umfassten Punktmutationen und Deletionen von 10 oder 15 bp innerhalb des *ramR*-Gens sowie einen singulären Basenaustausch in der Bindungsstelle für das RamR-Protein bei *Salmonella* Infantis-, Paratyphi- und Livingstone-Mutanten. Eine Insertion von 49 bp in dem *soxR*-Gen war für eine

erhöhte Expression des *soxS*-Gens und damit verbunden für eine verstärkte Effluxaktivität bei einer *S. Virchow*-Mutante verantwortlich. Diese Studie zeigte, dass Veränderungen in der *ramR-ramA* Region sowie im *soxR*-Gen auch in anderen *Salmonella*-Serovaren als Typhimurium auftreten und mit einer erhöhten Aktivität des AcrAB-Effluxsystems einhergehen.

KEHRENBURG *et al.* (2009). Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of *Salmonella* serovars other than Typhimurium: detection of novel mutations involved in modulated expression of *ramA* and *soxS*. *J Antimicrob Chemother* 64:1175-1180.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Deutschland); Unité de recherche en Infectiologie Animale et Santé Publique (IASP), Institut national de la recherche agronomique (INRA), Nouzilly, Frankreich

Transfer Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme zwischen Menschen und Hunden: zwei Fallberichte

Zwischen September 2007 und Januar 2009 wurden die in der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover vorgestellten Hunde auf die Präsenz Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme untersucht. Tupfer von Nase, Rachen und Perineum wurden untersucht. Die MRSA-Stämme von zwei Fällen, für die ausreichende Hintergrunddaten vorlagen, wurden mittels Multilocus Sequenztypisierung (MLST), *spa*-Typing, Makrorestriktionsanalyse mit *SmaI* und *Apal* sowie antimikrobieller Empfindlichkeitsprüfung untersucht. Die MRSA-Stämme wurden mittels PCR hinsichtlich des SCC mec -Typs und der Präsenz der PVL-Gene *lukS*-PV und *lukF*-PV getestet. In **Fall 1** wurde bei einem sechs Monate alten Hund ein MRSA-Stamm (ST398, *spa*-Typ t034) nachgewiesen, der sich in der Makrorestriktionsanalyse nicht mit *SmaI*, aber mit *Apal* typisieren ließ. Der Stamm war PVL-negativ, verfügte über eine Typ V SCC mec -Kassette und war resistent gegenüber β -Laktamantibiotika, Erythromycin, Clindamycin und Tetrazyklin. Der Tierbesitzer, ein Fachtierarzt für Schweine, war mit einem Stamm nasal kolonisiert, der exakt die gleichen Charakteristika aufwies. In **Fall 2** erwies sich ein elf Jahre alter Hund als Träger eines MRSA-Stammes (ST225, *spa*-Typ t014). Dieser Stamm war ebenfalls PVL-negativ, verfügte über eine Typ II SCC mec -Kassette und erwies sich als resistent gegenüber β -Laktamantibiotika, Erythromycin, Clindamycin und Enrofloxacin. Der Hund hatte regelmäßig Kontakt zu der 85-jährigen Schwiegermutter des Tierbesitzers, die im gleichen Haushalt lebte und wegen eines Dekubitus-Geschwürs am Fuß ambulante Pflege erhielt. Ein MRSA-Stamm, der dem des Hundes in den vorab genannten Charakteristika und in den *SmaI*- und *Apal*-Makrorestriktionsmustern entsprach, wurde von dem Dekubitus-Geschwür isoliert.

Der wahrscheinlichste Übertragungsweg des MRSA ST398-

Stammes in Fall 1 ist von Schweinen auf den Tierarzt und von diesem auf seinen Hund. In Fall 2 erfolgte die Übertragung des MRSA ST225-Stammes höchstwahrscheinlich von der Schwiegermutter auf den Hund. MRSA ST225-Stämme waren in den Jahren 2007 und 2008 die zweithäufigsten bei Menschen in Deutschland nachgewiesenen MRSA-Typen, während solche Stämme bislang bei Hunden nicht nachgewiesen wurden.

NIENHOFF *et al.* (2009) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. *J Antimicrob Chemother* 64, 660-662.

Klinik für Kleintiere und Zentrum für Infektionsmedizin, beide Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Medizinische Hochschule Hannover; Institut für Mikrobiologie, (alle Deutschland)

3 PARASITEN

3.1 TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii ist ein sich obligat intrazellulär vermehrender protozoärer Parasit, der alle warmblütigen Vertebraten einschließlich Säugetiere und Vögel infizieren kann. Bis zu einem Drittel der menschlichen Population sind mit *T. gondii* infiziert. Die meisten Primärinfektionen beim Menschen verlaufen asymptomatisch; manche Patienten erkranken an einer Lymphadenopathie oder einer okulären Toxoplasmose. Eine primäre, während der Schwangerschaft erworbene Infektion kann den Föten schwer schädigen. Bei immunsupprimierten Patienten kann eine Reaktivierung latenter Infektionen zu lebensbedrohlichen Enzephalitiden führen. Infektionen beim Menschen werden vor allem durch den Verzehr von rohem oder nicht ausreichend erhitztem Fleisch verursacht, das lebende Stadien von *T. gondii* enthält, oder durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln oder Wasser, kontaminiert mit Oozysten aus dem Kot infizierter Feliden. Die Populationsstruktur von *T. gondii* ist klonal. In Europa und Nordamerika herrschen die drei klonalen Typen I, II und III vor.

Nachweis und molekulare Typisierung von *T. gondii*

Zurzeit werden von uns Verfahren zum serologischen Nachweis von *T. gondii*-Infektionen bei verschiedenen Tierarten (Schwein, Schaf, Ziege, Geflügel, Katze, Hund) entwickelt, validiert und in epidemiologischen Untersuchungen angewendet. Des Weiteren sind Verfahren zum DNA-Nachweis und zur Genotypisierung von *T. gondii* etabliert worden. Diese werden zur Charakterisierung aus *T. gondii*-infizierten Tieren gewonnener Isolate eingesetzt. Der in Deutschland vorherrschende Genotyp ist der klonale Typ II. Besondere

Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit Humanerkrankungen verdienen aber *T. gondii*-Stämme mit atypischen Genotypen, die Rekombinationen aus den in Nordamerika und Europa vorherrschenden *T. gondii*-Klonotypen I, II und III darstellen, da diese in anderen Regionen mit bestimmten Manifestationsformen der humanen Toxoplasmose, insbesondere der okulären Toxoplasmose immunkompetenter Menschen assoziiert sind. Atypische *T. gondii* könnten durch sexuelle Rekombination unterschiedlicher klonaler Typen in Deutschland entstehen oder über Importe aus anderen Ländern nach Deutschland eingeschleppt werden.

BASSO *et al.* (2009). Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*) with fatal toxoplasmosis in Argentina. *Vet Parasitol* 161:201-206.

HOSSEININEJAD *et al.* (2009). Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG-1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. *Vet Parasitol* 164:315-319.

Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (alle Argentinien); Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran; Friedrich-Loeffler-Institut, IfE

3.2 NEOSPORA CANINUM

Die Neosporose zählt weltweit zu den am häufigsten diagnostizierten infektiösen Ursachen für bovine Aborte und Totgeburten. Man geht davon aus, dass sich die Mehrzahl der *Neospora caninum*-positiven Rinder pränatal bei der Mutter infiziert hat. Dieser vertikale Übertragungsweg ist sehr effizient und sichert *N. caninum* für mehrere Rindergenerationen das Überleben in einer einmal infizierten Zuchtlinie. Hunde und Kojoten sind Endwirte für den protozoären Infektionserreger. Endwirte scheiden im Kot Oozysten aus, die in der Umwelt längere Zeit überlebensfähig sind und wahrscheinlich über Kontaminationen des Futters oder des Trinkwassers zu Infektionen bei Zwischenwirten, wie zum Beispiel dem Rind, führen.

Verbreitung von *N. caninum* in deutschen Rinderbeständen

N. caninum-Infektionen führen auch in Deutschland in erheblichem Umfang zu Aborten und Totgeburten bei Rindern. So konnten in einer am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Erlangen unter Beteiligung des FLI durchgeführten Untersuchung bei 10 % der eingesendeten und untersuchten Rinderföten Hinweise auf *N. caninum*-Infektionen gefunden werden.

In einer von November 2005 bis April 2006 in Schleswig-Holstein durchgeführten Querschnittsstudie bei Milchkühen, bei der etwa 35 % der ca. 6.000 Milchkuhbetriebe mittels eines p38-Tankmilch-ELISA auf *N. caninum*-spezifische

Antikörper untersucht wurden, reagierten 1 % der Tankmilchproben positiv. Ein signifikant höherer Anteil positiver Herden kam aus Landkreisen mit einer Bevölkerungsdichte von mehr als 125 pro km². Eine frühere Untersuchung in Rheinland-Pfalz, bei der derselbe Tankmilch-ELISA eingesetzt wurde, ergab 7,9 % Sammelmilch-positive Herden. Die Untersuchungen bestätigen daher frühere Annahmen über eine regional unterschiedliche Verbreitung der *N. caninum*-Infektion in deutschen Rinderhaltungen. Ähnlich wie bei den Untersuchungen in Rheinland-Pfalz war auch in der vorliegenden Studie der Nachweis positiver Rinderherden mit einer erhöhten Bevölkerungsdichte assoziiert.

SCHARES *et al.* (2009). *Neospora caninum* in dairy herds in Schleswig-Holstein, Germany. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 122:47-50.

SÖRDEL *et al.* (2009). Beteiligung von *Neospora caninum* bei Rinderaborten in Nordbayern. *Tierärztl Umschau* 64:235-243.

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen; Institut für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München; Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen; Friedrich-Loeffler-Institut, IfE, (alle Deutschland)

Molekulare Typisierung

Es gibt zunehmend Hinweise, dass verschiedene *N. caninum*-Isolate unterschiedliche Virulenz-Eigenschaften besitzen können. So werden neben *N. caninum*-assoziierten Abortgeschehen bei Rindern auch häufig asymptomatische vertikale Übertragungen des Parasiten beobachtet, die für das infizierte Kalb folgenlos bleiben. Für zukünftige Untersuchungen ist es daher wichtig, *N. caninum*-Isolate mit möglichst großer Auflösung genetisch unterscheiden zu können. Daher wurden von uns Methoden weiter entwickelt, die eine Mikrosatelliten-gestützte Typisierung des Erregers auch dann ermöglicht, wenn die Nukleinsäure des Parasiten in nur geringer Menge oder verunreinigt durch die Nukleinsäuren des infizierten Wirts vorliegt.

BASSO *et al.* (2009). Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Vet Parasitol* 160:43-50.

BASSO *et al.* (2009). First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. *Vet Parasitol* 159:162-166.

Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (alle Argentinien); Vet Med Labor GmbH, Ludwigsburg; Friedrich-Loeffler-Institut, IfE, (beide Deutschland)

Immunologische Effektormechanismen in *N. caninum*-infizierten Zellen

Das Wachstum von *N. caninum* wird im Wesentlichen durch zellvermittelte Immunreaktionen kontrolliert. Sowohl unter natürlichen als auch unter experimentellen Bedingungen

spielt Gamma-Interferon (IFN- γ) eine herausragende Rolle bei der Regulierung des Wachstums von *N. caninum*. Es konnte gezeigt werden, dass in IFN- γ -aktivierten Fibroblasten und Endothelzellen vom Rind die Induktion des Tryptophan-abbauenden Enzyms Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO) für die Inhibition des Parasitenwachstums verantwortlich ist. Dieser antiparasitäre Effekt konnte sowohl durch die Zugabe von Tryptophan als auch durch Einsatz des IDO-spezifischen Inhibitors 1-L-Ethyltryptophan aufgehoben werden. Die Untersuchungsergebnisse zeigen daher, dass in Zellen von Menschen und Rindern derselbe Mechanismus zur Kontrolle des Wachstums von *N. caninum* wirksam ist.

SPEKKER *et al.* (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in the defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infect Immun* 77:4496-4501.

Institute für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; Friedrich-Loeffler-Institut, IfE, (beide Deutschland)

3.3 *BESNOITIA BESNOITI*

Besnoitia besnoiti wurde während des ersten in Deutschland aufgetreten Ausbruchs boviner Besnoitiose isoliert. Die Charakterisierung des Isolats mit der Bezeichnung Bb-GER1 durch Sequenzierung der Internal-Transcribed-Spacer-1-Region und des 5.8S-ribosomalen-RNA-Gens ergab eine nahezu 100%ige Identität mit anderen *B. besnoiti*-Isolaten, die in Portugal, Spanien, Israel oder Südafrika gewonnen worden waren. Weitere Untersuchungen haben zum Ziel, sensitive und spezifische diagnostische Tests zu entwickeln und bereits existierende Tests zu validieren.

SCHARES *et al.* (2009). First in-vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Vet Parasitol* 163:315-322.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE; Institut für Veterinärpathologie, Medizinische Kleintierklinik & Klinik für Wiederkäuer, Ludwig-Maximilians-Universität, München (alle Deutschland); Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (beide Argentinien); Laboratório de Parasitologia, ICAM, Núcleo da Mitra, Universidade de Évora, Portugal.

3.4 *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS*

Räumlich-zeitliche Analysen zur Epidemiologie des Kleinen Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*
 Infektionen von Menschen mit dem Larvenstadium des Kleinen Fuchsbandwurms *E. multilocularis* gelten in Mitteleuropa als die gefährlichste parasitär bedingte Zoonose. Der Parasit hat einen obligaten Wirtswechselzyklus. Infizierte Endwirte (*Canidae*, auch *Felidae*; in Europa vor allem der

Fuchs) beherbergen wenige bis zu mehreren 100.000 geschlechtsreife, 1-3 mm kleine Bandwürmer im Dünndarm und scheiden die auch für den Menschen infektiösen Eier mit der Losung aus. Diese bleibt über Monate an der bodennah wachsenden Vegetation infektiös. Natürliche Zwischenwirte sind Nager, die sich durch orale Aufnahme der Eier infizieren und das Larvenstadium in nahezu allen Fällen in der Leber beherbergen. Der Lebenszyklus schließt sich über die Räuber-Beute-Beziehung der End- und Zwischenwirte. Der Mensch infiziert sich als Fehl-Zwischenwirt. Es ist erst seit etwa 15 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. Eine möglichst genaue Kenntnis der zeitlichen und räumlichen Dynamik dieser Parasitose im natürlichen Lebensraum sowie der sie beeinflussenden Faktoren stellen Grundlagen für räumliche und zeitliche Risikobewertungen einschließlich Prüfung von Präventions- und Interventionsstrategien dar. Ein neuer Aspekt ist die Zuwanderung und Etablierung einer neuen Endwirtpopulation, bestehend aus dem Marderhund, im Osten Deutschlands. Epidemiologische Analysen bei so heterogen verteilten Infektionen in Wildtierpopulationen, insbesondere bei Wirtswechselzyklen, sind epidemiologisches Neuland. Daher ist dies auch ein Modellprojekt über die Erreger-orientierte Fragestellung hinaus. Zur Bearbeitung dieser Aufgabe muss eine geeignete Datenbasis (Datum und digitalisierter Ort der Streckung, diagnostischer Befund, andere epidemiologisch relevante Informationen, Stichprobendichte) geschaffen und über längere Zeiträume fortgeschrieben werden. Eigene Untersuchungen gestreckter Füchse, zunehmend auch Marderhunde (Einsendungen durch Unterstützung aus verschiedenen anderen Projekten) bilden den belastbaren Daten-Kernbereich, daneben wurden in Kooperation auch andere Datenbasen für dieses Projekt nutzbar gemacht und eingebunden. Das schließt auch die Evaluierung und Harmonisierung der diagnostischen Methoden ein sowie die Prüfung, ob mit im Freiland gesammelten Losungsproben die regionale epidemiologische Situation überwacht werden kann. Zur Verarbeitung dieser Daten wurden neue epidemiologische Analysekonzepte, auch unter Einbeziehung Geographischer Informationssysteme, entwickelt und evaluiert.

PITRA *et al.* (2010). Going west - invasion genetics of the alien raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* in Europe. *Eur J Wildl Res* 56:117-129

SUTOR, A., K. KAUHALA UND H. ANSORGE (2009). Diet of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) - a canid with an opportunistic foraging strategy. *Acta Theriologica* (in press)

Leibniz Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Forschungsgruppe Evolutionsgenetik, Berlin; Friedrich-Loeffler-Institut, IfE

4 PRIONEN – TRANS-MISSIBLE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSEs), auch Prionkrankheiten genannt, sind fatale neurologische Erkrankungen, die unter anderem Scrapie bei kleinen Wiederkäuern, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen einschließen. Gemäß der von S. Prusiner aufgestellten „Protein-only“-Hypothese werden Prionkrankheiten allein durch die Konformationsänderung eines zellulären körpereigenen Prion-Proteins (PrP^C) in eine abnorme Isoform (PrP^{Sc}) verursacht.

Für die Erforschung der TSE-Erkrankungen stehen verschiedene diagnostische Nachweismethoden und ein breites Spektrum an Untersuchungssystemen zur Verfügung. Diese reichen von den Infektionsstudien am Tier über die Zellkulturen bis zu den Studien in zellfreien Systemen.

Proteomkarte der Cerebrospinalflüssigkeit des Rindes

Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) wird bei der Suche nach Biomarkern zur Frühdiagnose von neurodegenerativen Erkrankungen wie CJD und BSE verwendet. CSF umgibt das Gehirn und das Rückenmark und fungiert als Zwischenstufe zwischen peripherem Blutkreislauf und dem Gehirngewebe. Metabolite, die vom Gehirn- und Rückenmarksgewebe in die CSF abgegeben werden, reflektieren den metabolischen Status des Gehirns sowohl unter gesunden Bedingungen als auch bei verschiedenen Erkrankungen. Zur Erkennung krankheitsassoziierter Veränderungen ist eine detaillierte Kenntnis des normalen CSF-Proteoms notwendig. Im Gegensatz zu sehr detaillierten und umfangreichen humanen CSF-Proteomkarten sind für Gewebe und Körperflüssigkeiten von Rindern bisher nur wenige zweidimensionale (2-D) Proteomkarten verfügbar. Das Fehlen einer solchen hochauflösenden Rinder-CSF-Proteomkarte war für uns Anlass, alle Rinder-CSF-Proteine zu bestimmen, die in einem 2-D-Gel dargestellt werden können. Unter Verwendung hochmoderner 2-D-Elektrophorese-Technologien (2-DE) in Kombination mit sensitiver Fluoreszenz-Proteinfärbung und MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie wurde eine hochauflösende und umfangreiche Referenz-2-DE-Karte des Rinder-CSF-Proteoms erstellt. Diese Karte enthält insgesamt 66 verschiedene Proteine, von denen 58 noch nicht als solche annotiert waren.

BRENN *et al.* (2009). A comprehensive proteome map of bovine cerebrospinal fluid. *Proteomics* 9:5199-5205.

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT und IMB

Inhibition der Prion-Amplifikation durch dominant-inhibitorische Mutanten – Eine systematische Studie mit Insertionsmutanten

Prionerkrankungen werden gemäß der Prion-Hypothese durch maligne körpereigene Eiweiße („sog. Prionen“ – „proteinaceous infectious particles“) ausgelöst. Die Umwandlung (Konversion) des zellulären Prion-Proteins PrP^C in die pathogene Isoform PrP^{Sc} geht dabei mit der Zunahme von β -Faltblattstrukturen und der Veränderung biochemischer Eigenschaften (z. B. partielle Resistenz gegenüber proteolytischen Abbau) einher. Die veränderten Eigenschaften führen zur Aggregation und Bildung amyloider Fibrillen. Das zelluläre Prion-Protein besteht aus zwei Domänen, einem unstrukturierten N-terminus und einem C-Terminus mit drei β -helikalen Regionen und zwei anti-parallelen β -Faltblättern. Im Gegensatz zu PrP^C konnte die Struktur von PrP^{Sc} bisher aufgrund der Fibrillenbildung noch nicht exakt aufgeklärt werden. Aggregation und Fibrillenbildung wird auch bei anderen Proteinen beobachtet, die andere Proteinfehlfaltungskrankheiten auslösen können.

Das Ziel dieser Untersuchungen war die Analyse derjenigen Regionen innerhalb des Prion-Proteins, PrP, die für die Umfaltung (Konversion) der zellulären Form PrP^C in die pathogene Form, PrP^{Sc}, verantwortlich sind. Dazu wurden 33 Insertionsmutanten generiert, die an verschiedenen Stellen innerhalb des PrP eine zusätzliche Kemptidsequenz (Heptapeptid) besaßen. Die Konstrukte wurden mittels eines retroviralen Expressionssystems in drei verschiedenen Scrapie-infizierten Zelllinien exprimiert. Insertionen im Bereich der Aminosäuren 100-214 führten, abgesehen von einigen Ausnahmen, zu einer Hemmung der Konversion. Insertionen im Bereich der Aminosäuren (AS) 130-154 und 196-200, der potentiellen Protein X-Bindungsstelle (AS 166-172) und der unstrukturierten N-terminalen Region 100-112 führten zu einer transdominanten Inhibition der Konversion. Die Untersuchungen wurden durch 3D-Strukturen der Mutanten ergänzt, die mittels Computer-Modeling generiert wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass innerhalb des Prion-Proteins genau definierte Bereiche vorliegen, die die Konversion spezifisch inhibieren und daher potentielle Targets für therapeutische Angriffspunkte darstellen.

GEISSEN *et al.* (2009). Inhibition of prion amplification by expression of dominant inhibitory mutants - a systematic insertion mutagenesis study. *Infect Disord Drug Targets* 9:40-47

KUPFER *et al.* (2009). Prion protein misfolding. *Curr Mol Med* 9:826-835.

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT; Universität Greifswald, Institut für Molekulare Strukturbiologie; Technische Universität München, Institut für Virologie (alle Deutschland); Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Canada.

Die unterschiedliche Löslichkeit von Prionen ist mit verschiedenen Phänotypen assoziiert

Prion-Erkrankungen gehen mit einer Akkumulation von pathologischem Prion-Protein einher, welches durch die Umfaltung von zellulärem Prion-Protein entsteht. Zelluläres Prion-Protein liegt in der Zelle in unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen vor. Insofern kann die selektive Rekrutierung bestimmter Modifikationsformen auch Einfluss auf die Eigenschaften des gebildeten PrP^{Sc} haben. Bisher ist allerdings noch wenig über die Expression, Regulation und Modifikation des PrP^C bekannt. Im Rahmen der in dieser Veröffentlichung dargestellten Untersuchungen wurden Unterschiede bei der SDS-Löslichkeit von PrP^C festgestellt. In humanen, ovinen und bovinen Gehirnhomogenaten wurden niedrig- und hochlösliche Fraktionen gefunden. Diese Ergebnisse belegen die Existenz unterschiedlicher PrP^C-Formen im Gehirn, die auch durch Unterschiede bei deren Glykosylierung charakterisiert sind. Damit könnten letztendlich auch Unterschiede bei der Glykosylierung verschiedener TSE-Stämme assoziiert sein.

Kuczius *et al.* (2009). Differential solubility of prions is associated in manifold phenotypes. *Mol Cell Neurosci* 42:226-233

Institut für Hygiene, Westfälische Wilhelms-Universität Münster; Friedrich-Loeffler-Institut, INNT, (beide Deutschland)

Analyse von Nukleinsäuren in einem experimentellen Modell für bovine Transmissible Spongiforme Enzephalopathie

Epidemiologische Ansätze zur Kontrolle einer Erkrankung erfordern Testmethoden, die Individuen mit hohem Risiko identifizieren können. Da natürliche Antikörper gegen pathologisches Prion-Protein kaum gebildet werden, konnte bisher kein darauf beruhender Immunoassay für lebende Tiere (*ante mortem*) entwickelt werden. Ein anderer epidemiologischer *Ante-mortem*-Ansatz ist die Messung von zirkulierenden Nukleinsäuren (CNA). CNAs sind effektive Marker zur Überwachung von Erkrankungen, die mit viralen Gensequenzen assoziiert sind. In dieser Studie wurden nun Ansatzpunkte für die Anwendung von CNAs als mögliche Biomarker bei chronischen Krankheiten wie z. B. BSE gefunden. Es wurden Nukleinsäureveränderungen im Serum oder Plasma bestimmt. Diese Nukleinsäuresequenzen sind teilweise homolog zu sogenannten repetitiven Sequenzen in „flanking regions“, die in vielen Genen – auch dem *PrP*-Gen – zu finden sind. CNAs wurden aus dem Plasma oder Serum extrahiert und amplifiziert. Zunächst fanden sich im Serum einzelne Basensequenz-Unterschiede (SNPs) in sich wiederholendengenomischen Nukleinsäure-Folgen zwischen infizierten Tieren und Kontrolltieren. Die Signalstärke wurde mit der von normalen Kontrollproben verglichen. Proben, die wiederholt mehr als fünf Standardabweichungen über den Normalkontrollen lagen, wurden als reaktiv eingeordnet. Die Kombination dieser einzelnen Marker erlaubte unter bestimmten Umständen BSE- und CWD-Infektionen zu

erkennen. In der Studie konnten im Serum sich wiederholende genomische Nukleinsäuresequenzen (RGNASs) sowohl von bestätigten BSE-Kühen als auch Kohorten sowie Kontrollen festgestellt werden. Der Polymorphismus dieser RGNASs kann ein Kandidat für eine Detektion von subklinischen Krankheitsprozessen sein. Zur Bestätigung dieser Serum-RGNAS-Polymorphismen bei BSE wurden Proben aus der BSE-Pathogenesestudie am FLI genutzt, bei der Rinder oral je 100 g eines Mazerates aus Kontroll- oder BSE-infiziertem Hirn verabreicht bekamen. Von diesen Tieren wurden regelmäßig Serumproben genommen. Serumproben von klinisch erkrankten Tieren (15 infizierte Tiere, 6 nicht-infizierte Kontrollen (jeweils 40 Monate p.i.) und 5 zufällig gewählte Tiere). Die Analyse von 65 Sequenzen in diesen Seren zeigte, dass RGNAS-Polymorphismen in allen infizierten Tieren vorhanden waren, nicht aber in den Kontrollen. Zusätzlich konnte der o. g. Polymorphismus im Serum von non-RGNASs bei BSE-infizierten Rindern als signifikant verschieden ($P < 0.01$) von den Kontrollen identifiziert werden. Die Daten zeigen allerdings auch die Komplexität dieser Untersuchungsmethodik.

Beck *et al.* (2009). Serum nucleic acids in an experimental bovine Transmissible Spongiform Encephalopathy model. *Zoon Publ Health* 56:384-390.

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT; Institut für Veterinärmedizin, Universität Göttingen, (beide Deutschland)

Diagnose der ersten Scrapie-Fälle in Polen

Atypische Scrapie wurde erstmals in Deutschland und Frankreich festgestellt (Buschmann *et al.* 2004). Seitdem wurden zahlreiche Fälle in nahezu allen EU-Mitgliedsstaaten sowie in Nordamerika und auf den Falkland-Inseln diagnostiziert. Die Natur dieses TSE-Stamms ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings ergaben epidemiologische Studien eindeutige Hinweise auf ein spontanes Auftreten der Erkrankung (Fedieavsky *et al.* 2009).

Hirnstammproben von für den menschlichen Verzehr geschlachteten kleinen Wiederkäuern und von gefallen Tieren müssen stichprobenartig auf das Vorliegen einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE) mit Hilfe eines dafür zugelassenen TSE-Schnelltests untersucht werden. Im Lauf dieser Untersuchung wurden in Polen zwei TSE-positive Schafe identifiziert. Bei weitergehenden Untersuchungen stellte sich heraus, dass es sich hierbei um atypische Scrapiefälle handelte. Dies war der erste Nachweis von Scrapie bei Schafen in Polen seit dem EU-Beitritt dieses Landes.

POLAK *et al.* (2009). Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. *Vet J.* [Epub ahead of print; doi:10.1016/j.tvjl.2009.07.032]

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT; National Veterinary Research Institute, Pulawy, Poland; Department of Bacteriology and TSEs, Central Veterinary Institute (CVI) of Wageningen, The Netherlands.

Scrapie in Ziegen – ein aktueller Überblick für Europa

Zu den transmissiblen spongiformen Enzephalopathien der Tiere gehört die Scrapie bei Schaf und Ziege, die als Prototyp dieser Erkrankungsgruppe angesehen werden kann. In den letzten Jahren sind bei der Ziege zudem zwei natürlich aufgetretene BSE-Infektionen diagnostiziert worden. Insgesamt ist jedoch nur wenig zu TSE-Erkrankungen bei Ziegen bekannt, daher ist eine Risikoabschätzung capriner BSE-Erkrankungen schwierig. Natürlich auftretende Scrapie-Infektionen der Ziegen sind innerhalb Europas verbreitet, treten vorwiegend jedoch in Ländern mit einer hohen Ziegenpopulation auf. Wie bereits beim Schaf beschrieben, wird auch bei der Ziege die Empfänglichkeit für die Erkrankung ebenso wie die Inkubationsperiode durch das Prion-Protein Gen (PRNP) kontrolliert. Übereinstimmend mit den Verhältnissen beim Schaf zeigt auch das caprine PRNP eine größere Variabilität als es beispielsweise beim Rind und beim Menschen der Fall ist. Obwohl Schaf und Ziege zahlreiche identische Allele aufweisen, unterscheidet sich die Variabilität des PRNP. So tritt beispielsweise das ARR-Allel, das beim Schaf mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Scrapie assoziiert ist, bei der Ziege nicht auf. Hingegen zeigen bei der Ziege andere Varianten des PRNP eine erhöhte Resistenz gegenüber der Erkrankung. Der vorliegende Übersichtsartikel gibt eine Zusammenstellung derzeit bekannter Daten zur Situation capriner TSE-Erkrankungen innerhalb Europas. Dabei wird vor allem auf die Epidemiologie der Erkrankung und auf die bekannten genetischen Variabilitäten des caprinen PRNP eingegangen.

VACCARI *et al.* (2009). State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet Res* 40:48.

Unit of Transmissible Spongiform Encephalopathies and Emerging Infectious Diseases of Animals, Istituto Superiore di Sanità, Italien; Aristotle University of Thessaloniki, Laboratory of Pharmacology, Griechenland; Centro Nacional de Referencia de las EET en España, Universidad de Zaragoza, Spanien; Centro di Referenza per le Encefalopatie Animali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Turin, Italien; UMR INRA ENVT 1225, Toulouse, Frankreich; Central Veterinary Institute of Wageningen UR (CVI), Department of Bacteriology and TSEs, Lelystad, Niederlande; Friedrich-Loeffler-Institut, INNT; Roslin Institute and R(D)SVS University of Edinburgh, Roslin, UK

Komplementaritätsbestimmende Regionen eines „single-chain“ Fragmentes der variablen Region eines Anti-Prion-Protein-Antikörpers vermitteln Konformationspezifität und Antiprionenaktivität

Das Prion-Protein PrP existiert in verschiedenen stabilen Konformationen, wobei die PrP^{Sc} Konformation mit transmissiblen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert ist. Eine Blockade von PrP durch hochaffine Liganden stellt einen effektiven Mechanismus zur Prävention einer peripheren Prion-Infektion dar. In der vorliegenden Arbeit wurden bakteriell in *E. coli* exprimierte „single-chain“

Fragmente (scFv) der variablen Domäne des monoklonalen Antikörpers W226 hergestellt, der gegen gereinigtes PrP^{Sc} generiert worden war und sowohl die zelluläre Prion-Isoform PrP^C als auch die pathologische PrP^{Sc}-Isoform erkennt. Dieses „single-chain“ Fragment besitzt eine Dissoziationskonstante mit rekombinantem PrP von 2nM und konnte Prionen aus persistent infizierten ScN2a Zellen bei einer Konzentration von 4 nM eliminieren. Diese Reinigung von Zellen mit Hilfe des Fragmentes konnte auf Proteinebene im Western Blot sowie in Maus-Bioassays gezeigt werden. Ein Peptid, das der Komplementaritätsbestimmenden Region 3 der schweren Antikörperkette entsprach, (CDR3H), konnte zwar noch spezifisch das PrP^{Sc} binden, besaß allerdings keine Anti-Prion-Aktivität mehr. Im Gegensatz dazu zeigte ein verändertes synthetisches Peptid mit hoher Protease-Resistenz, das der Topologie des CDR3H entspricht – ein sogenanntes Retro-inverso-D-Peptid von CDR3H – sowohl Bindung an PrP^{Sc} als auch wiederum Anti-Prion Aktivität. Das „single-chain“ Fragment des Antikörpers W226 stellt mit ca. 30 kDa das bisher kleinste Peptid mit im Bioassay bestätigter Anti-Prion-Aktivität dar.

MÜLLER-SCHIFFMANN *et al.* (2009). Complementarity determining regions of an anti-prion protein scFv fragment orchestrate conformation specificity and antiprion activity. *Mol Immunol* 46:532-540.

Heinrich-Heine-Universität, Dep. Neuropathologie, Düsseldorf; Friedrich-Loeffler-Institut, IfI

De-Novo-Generierung einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie durch Maus-Transgenese

Die meisten Formen der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien wie die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung, BSE und Scrapie entstehen spontan oder durch Infektion (Übertragung). Mutationen des Prion-Gens PRNP, welches für das Prion-Protein PrP kodiert, segregieren mit phänotypisch ähnlichen Erkrankungen. Während die Prion-Proteine der meisten Säugetiere, z. B. von Mensch, Rind und Schaf, in einer bestimmten Region des PrP (Aminosäure 166-175) eine flexible Form aufweisen, ist diese Region bei Elchen und Hirschen, die an der Prionenerkrankung Chronic Wasting Disease erkranken, präzise festgelegt. Durch die Einführung von zwei Punktmutationen in das Maus-PRNP wurde eine mutante Form des Maus-Prion-Proteins hergestellt, das statt einer flexiblen eine starre Proteinschleife aufwies. Eine moderate Überexpression dieses mutierten Prion-Gens in transgenen Mäusen verursachte das Auftreten einer tödlich verlaufenden spongiformen Enzephalopathie mit zerebraler Plaquelagerung. Diese genetisch bedingte Erkrankung war nach intrazerebraler Inokulation von Gehirnhomogenaten auf das Wildtyp PrP überexprimierende tg20 Mäuse übertragbar. In einer weiteren Übertragungsrunde konnte dann die Erkrankung durch Homogenat dieser tga20 Mäuse wiederum auf Wildtyp-Mäuse übertragen werden. Dies gelang nicht in Prion-defizienten Mäusen, wodurch die ursächliche

Beteiligung des Prion-Proteins an diesem Phänomen gezeigt werden konnte. Bei weiteren Übertragungszyklen konnte eine Verkürzung der Inkubationszeiten sowie eine erhöhte Protease-Resistenz nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf eine Überwindung der Prion-Stamm-Barriere ist. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression eines geringfügig veränderten Prion-Proteins, dessen dreidimensionale Struktur bekannt ist, sehr effizient eine Prion-Erkrankung induzieren kann.

SIGURDSON *et al.* (2009). De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci* 106:304-309.

Universitätsspital Zürich, Institut für Neuropathologie; ETH Zürich, Institut für Molekularbiologie und Biophysik (beide Schweiz); Universität Wien, Österreich; Institute of Laboratory Animal Sciences; Universität Lodz, Dept. of Molecular Pathology and Neuropathology, Polen; Friedrich-Loeffler-Institut, IfI; Scripps Research Institute, Department of Molecular Biology, La Jolla, USA

5 VETERINÄR- MEDIZINISCHE ENTOMOLOGIE

Was macht ein Insekt zum Vektor?

Blut saugende Insekten übertragen eine Vielzahl von Viren, Bakterien, Protozoen und Helminthen auf Wirbeltiere. Die Entwicklungszyklen der Mikroorganismen in ihren Vektoren und die Transmissionsmechanismen sind häufig extrem komplex und das Resultat einer langen Koevolution von Überträger und übertragenem Pathogen mit gegenseitiger Anpassung. Die Bedingungen, die erfüllt sein müssen, damit ein Insekt zum Vektor wird, sind vielfältig. Benötigt wird aber eine angeborene Vektorkompetenz als genetische Grundlage. Die Verfügbarkeit von Infektionsquellen vorausgesetzt, sind neben der Vektorkompetenz zahlreiche entomologische, ökologische und erregerspezifische Faktoren entscheidend. Die verschiedenen Routen der Erregerübertragung durch Vektoren stehen in Verbindung mit den Entwicklungswegen der Erreger durch das Insekt. Insbesondere bei salivar übertragenen Pathogenen stehen der Wanderung im Insekt vom Mitteldarm über das Hämozöl bis in die Speichelflüssigkeit verschiedene zelluläre und azelluläre Barrieren, inkl. Komponenten des Immunsystems der Insekten, entgegen. Bei intrazellulärer Entwicklung sind Rezeptor-vermittelte Invasionsmechanismen relevant. Als Umweltfaktor hat die Temperatur eine herausragende Bedeutung für die Vektorrolle hämatophager Insekten. Sie hat nicht nur einen beträchtlichen Einfluss auf die

Entwicklungsdauer des Pathogens im Vektor (extrinsische Inkubationsperiode), sondern kann auch vermeintlich Vektor-inkompetente Insekten zu Vektoren machen („leaky gut“-Phänomen). Wichtig sind aber auch Verhaltensweisen des Insekts und des Pathogens, die einen Kontakt überhaupt erst ermöglichen, wie z. B. Blutwirtpräferenzen, saisonales Auftreten und zirkadiane Stechaktivität auf Seiten des Insekts sowie tageszeitliche Periodizität auf Seiten des Erregers.

KAMPEN, H. (2009) Was macht ein Insekt zum Vektor? *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:451-457.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED

Analyse der Verbreitung der Zecke *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in einem Naturschutzgebiet Westdeutschlands mit Hilfe von geographischen Informationssystemen

Von Mai bis November 2003 wurden an fünf ausgewählten Stellen des Siebengebirges, einem Naturreservat in der Nähe von Bonn, Deutschland, wöchentlich Daten zu Mikroklima, Pedologie, Pflanzensoziologie und Zeckenabundanz gesammelt und miteinander in Beziehung gebracht. Bei einer Gesamtausbeute von 2.880 wirtsuchenden *Ixodes ricinus*-Zecken (2.660 Nymphen, 172 Adulte) wurde eine maximale Zeckenabundanz im Juni und ein weiterer kleinerer Anstieg in der Abundanz im August festgestellt. Die räumliche und zeitliche Variation in der Zeckenabundanz war eng an die Lufttemperatur, die relative Luftfeuchtigkeit, den Bodenwassergehalt und den speziellen Vegetationstyp gebunden. Anstiege in den Zeckenabundanzen in einzelnen Mikrohabitaten sind wahrscheinlich als Folge von Klimaveränderungen und/oder anthropogenen Interventionen zu sehen, wie z. B. der Zunahme in den Beständen von Wildschweinen, die als Wirte von *I. ricinus* dienen. Unter zusätzlicher Verwendung von Daten aus früheren Studien konnte eine Korrelation von Pflanzengesellschaft und sechs semiquantitativen Zeckenabundanz-Kategorien, die von ‚zeckenfrei‘ bis ‚sehr hohe Zeckenabundanz‘ reichten, hergestellt werden. Eine GIS-Analyse zeigte, dass 56,5 % des Siebengebirges aus Pflanzengesellschaften bestehen, die zu den drei höchsten Zeckenabundanz-Kategorien gehören. Es kann resümiert werden, dass sich das Risiko von Besuchern des Siebengebirges, Zeckenstiche zu erhalten und mit *Borrelia burgdorferi* s.l. infiziert zu werden, erhöht hat.

SCHWARZ *et al.* (2009) Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *Int J Hyg Environ Health* 212:87-96.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMED; Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie; Institut für Hygiene und Öffentliches Gesundheitswesen, Universität Bonn (alle Deutschland)

6 IMMUNOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE

6.1 IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN

Rolle von ko-inhibierenden Immunrezeptoren bei der antiviralen Immunreaktion

Die Kontrolle viraler Infektionen erfordert eine komplexe, gut koordinierte Immunantwort, die durch Signale einer Vielzahl von ko-inhibitorischen und ko-aktivierenden Immunrezeptoren reguliert wird. Bei Gammaherpesvirus-Infektionen wurde die Rolle von ko-aktivierenden Immunrezeptoren mehrfach untersucht; Untersuchungen über die mögliche Funktion von ko-inhibitorischen Immunrezeptoren liegen jedoch bislang nicht vor. CEACAM1 ist ein ko-inhibitorischer Immunrezeptor, der von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Mit Hilfe von CEACAM1-Knock-out-Mäusen konnten wir die In-vivo-Funktion von CEACAM1 während der akuten und latenten Phase der murinen Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) Infektion untersuchen. CEACAM1^{-/-}-Mäuse zeigten einen erhöhten MHV-68-spezifischen Antikörpertiter, aber eine reduzierte T-Zell-vermittelte Immunreaktion, was sich in einem niedrigeren Virustiter während der Akutphase und einer verstärkten Splenomegalie und einer erhöhten Viruslast während der Latenzphase widerspiegelte. Diese Untersuchungen zeigten, dass ko-inhibitorische Immunrezeptoren bei der Kontrolle von Gammaherpesvirusinfektionen eine funktionelle Bedeutung haben. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

ADLER *et al.* (2009). Perturbation of lytic and latent gammaherpesvirus infection in the absence of the inhibitory receptor CEACAM1. *PLoS ONE* 4:e6317.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfI; Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München; Institut für Virologie, Technische Universität München; LIFE Zentrum Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München (alle Deutschland); Goodman Cancer Centre, McGill University, Montreal, Canada

Zellstress und Immunität

Eine Immunreaktion wird durch Gefahrensignale eingeleitet, die von geschädigten Geweben freigesetzt werden. Das Aussenden von Gefahrensignalen wird durch Einflüsse ausgelöst, die in Zellen Stress auslösen. Zu diesen Stressoren gehören Infektionserreger, zytotoxische Zellen, aber auch physikalisch-chemische Reize. Stressreaktionen sind komplexe Vorgänge, während deren das Transkriptom der Zelle dramatische Veränderungen erfährt, welche bisher nur ungenügend untersucht sind. So ist bisher

völlig unbekannt, wie gut die induzierte Immunreaktion an den auslösenden Stress angepasst ist und was dafür die molekularen Grundlagen sind. Eine ungenügend angepasste Immunreaktion könnte eine wesentliche Ursache für das Versagen der immunologischen Kontrolle von Infektionskrankheiten sein. Wir haben bislang anhand der Transkriptomänderungen mittels Oligonukleotid-Microarray-Analysen die Reaktion von epithelialen Zellen auf oxidativen Stress (photodynamische Therapie) und auf die Attacke von zytotoxischen T-Zellen untersucht. Bei diesen Analysen hat sich gezeigt, dass die Reaktion stark vom auslösenden Stress abhängig ist. Bei der photodynamischen Therapie wurde eine vor allem auf der Aktivierung von Granulozyten basierende Immunreaktion ausgelöst. Beachtet man den bei der photodynamischen Therapie, die in jüngster Zeit vermehrt für die Behandlung von bösartigen Tumorerkrankungen eingesetzt wird, ausgelösten Gewebsuntergang, so legt die beobachtete Aktivierung der neutrophilen Granulozyten nahe, dass diese Tumorantigene vermehrt aufnehmen und zu den regionären Lymphknoten transportieren können. Der Transport von Tumorantigenen in die regionären Lymphknoten ist ein entscheidender Schritt bei der Induktion einer antitumoralen Immunantwort. Dieser Mechanismus könnte dem Erfolg der photodynamischen Therapie bei Patienten mit bösartigen Gehirntumoren zugrunde liegen. Das Fernziel dieser Untersuchungen besteht darin, die Stressreaktion von Körperzellen gezielt therapeutisch zu modifizieren, um eine der Noxe optimal angepasste Immunantwort auszulösen.

KAMMERER *et al.* (2009). The molecular basis of prostate cancer cell escape from protoporphyrin IX-based photodynamic therapy. *Med Laser Appl* 24:237–246.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfI; LIFE Zentrum Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, Urologische Klinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, (alle Deutschland)

6.2 IMMUNSYSTEM DER FISCHER

Dem Immunsystem der Säuger ähnlich bilden Fische lösliche immunrelevante Faktoren (Immunglobuline, Zytokine etc.) und verfügen über Leukozytensubpopulationen, die die Immunantwort gegenüber einer Reihe von Pathogenen manifestieren. Die Existenz von spezifischen zytotoxischen Zellen und NK-ähnlichen Zellen wurde bei Fischen von uns in der Vergangenheit an allogenen, xenogenen und virusinfizierten Effektor/Zielzellsystemen gezeigt. Expressionsstudien bezüglich der bisher bekannten immunrelevanten piscinen Gene (z. B. MHC, TCR, CD8, CD56 und TLR) deuten darauf hin, dass bei Fischen ähnliche Immunmechanismen wie bei Säugern existieren. T-Zell- und NK-Zellsubpopulationen konnten jedoch bisher noch nicht direkt identifiziert werden, da geeignete Antikörper

(CD8 bzw. CD56) für deren Nachweis am FLI noch in der Entwicklung sind.

Charakterisierung zweier Schlüsselmoleküle des angeborenen Immunsystems der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*): MyD88 und SAA

Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören zu den Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) und sind essentielle Rezeptormoleküle des angeborenen Immunsystems von Vertebraten. Eine TLR-Aktivierung durch sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMP) führt zu einer Aktivierung weiterer Moleküle der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade, was schließlich zur Aktivierung immunrelevanter Effektorgene führt. In diesem Projekt haben wir die Genexpression zweier Schlüsselmoleküle des angeborenen Immunsystems der Regenbogenforelle, des TLR-Adapterproteins MyD88 und eines Effektormoleküls der TLR-Signaltransduktionskaskade, Serumamyloid A, untersucht. Beide Faktoren weisen eine bemerkenswerte Homologie im Vergleich zu orthologen Genen der Säuger auf und werden durch Infektion mit VHSV stimuliert. Dies lässt darauf schließen, dass deren entsprechende Funktionen zwischen Knochenfischen und Säugern ebenfalls konserviert sind.

REBL *et al.* (2009). Characterization of two key molecules of teleost innate immunity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): MyD88 and SAA. *Vet Immunol Immunopathol* 131:122-126.

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN), Dummerstorf; Friedrich-Loeffler-Institut, IMED, (beide Deutschland)

Die Expression des Peptidylarginindeiminase-Gens ist in Süßwasser- und Brackwasser-adaptierten Regenbogenforellen unterschiedlich

Eine Peptidylarginindeiminase (PAD)-ähnliche cDNA Sequenz wurde in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) isoliert. Sie enthält eine 111 bp lange nicht-translatierte Region (UTR) am 5' und eine 731-bp UTR am 3' Ende sowie einen 2.010 bp großen offenen Leserahmen, der für ein Protein von 669 Aminosäuren kodiert. In Gegenwart von Ca-Ionen katalysiert das PAD die posttranslationale Modifikation von Citrullin. In Säugern ist PAD in einer Reihe von regulatorischen Prozessen während der Zellentwicklung und -differenzierung wie der Hautkreatinisierung, der Myelinreifung und der Histondeiminierung beteiligt. Bisher wurden bei Säugern fünf PAD Isotypen, in Knochenfischen jedoch nur ein Isotyp sequenziert, der hoch konservierte Aminosäuremotive enthält, die für die Katalyse und die Kalziumbindung verantwortlich sind. Die Homologie zwischen PAD Sequenzen von Fischen beträgt ca. 67 %.

PAD mRNA ist hoch exprimiert in Haut, Flossen, Kiemen, Gehirn und Milz, während im Fettgewebe keine PAD mRNA

nachgewiesen werden konnte. Mittels quantitative *real-time* RT-PCR wurde eine unterschiedliche Expression des PAD Gens in verschiedenen Geweben zweier Forellenstämme, dem Stamm Steelhead und dem Brackwasser-adaptierten Stamm BORN, nachgewiesen. Diese unterschiedliche Expression ist möglicherweise einer der Gründe für die höhere Resistenz des Stammes Born in Brackwasserbedingungen.

REBL *et al.* (2009) Peptidylarginine deiminase gene is differentially expressed in freshwater and brackish water rainbow trout. *Mol Biol Rep* [Epub ahead of print; doi:10.1007/s11033-009-9738-5]

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN), Dummerstorf; Friedrich-Loeffler-Institut, IMED, (beide Deutschland)

6.3 ALLGEMEINE IMPFSTOFF-ENTWICKLUNG UND IMMUNTHERAPIE

Entwicklung von rekombinanten Baculoviren für den *In-vivo*- und *In-vitro*-Gentransfer in Vertebratenzellen (BacMam Technologie)

Das Baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) gehört zur Familie *Baculoviridae*, Genus *Nucleopolyhedrovirus*. Sein Genom besteht aus doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 134 kbp. Baculoviren gelten auf Grund ihres sehr engen Wirtsspektrums und des Fehlens nachweisbarer Genexpression in Säugerzellen als sichere virale Vektoren. Baculoviren können allerdings Säuger-, Vögel- und Fischzellen nicht-produktiv infizieren und in ihrem Genom inserierte Transgene unter der Kontrolle von Promotoren, die in diesen Zellen aktiv sind, exprimieren. Diese sogenannte BacMam Technologie ist eine attraktive Alternative für den Gentransfer durch vermehrungsfähige virale Vektoren. Deshalb wurden zur gleichzeitigen Expression von zwei Proteinen neuartige Doppelexpressionsvektoren konstruiert, die Enhancer/Promotorelemente des murinen (MCMV) und des humanen Cytomegalievirus (HCMV) auch in Kombination mit den baculoviralen Polyhedrin- und p10-Promotoren enthalten, um eine Expression sowohl in Vertebraten- als auch in Insektenzellen zu ermöglichen. *In-vitro*-Analysen ergaben, dass eine Doppelexpressionskassette, die die MCMV immediate early 1 (MCMV-ie1) Region mit dem immediate early Enhancer/Promoter des HCMV (HCMV-ie) kombiniert, nach BacMam Transduktion in Vertebratenzellen hohe Proteinmengen von beiden Transkriptionseinheiten ergibt. Für die Proteinexpression in Vertebratenzellen und in Insektenzellen erwies sich ein Hybridpromotor aus MCMV-ie1 und p10-Promotor den anderen Kombinationen aus HCMV-ie und p10- oder Polyhedrin-Promotor überlegen.

KEIL *et al.* (2009). Novel vectors for simultaneous high-level dual protein expression in vertebrate and insect cells by recombinant baculoviruses. *J Virol Meth* 160:132-137.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

Neue Baculovirus-Rekombinanten schützen Mäuse gegen eine letale Pseudorabies Virusinfektion

Im Rahmen eines gemeinsamen EU-Projektes wurden neue Vektorsysteme zur Entwicklung verbesserter Impfstoffe gegen virale Erkrankungen untersucht. Neue Baculovirus-Rekombinanten wurden hergestellt, die in ihren Virionen neben den Glykoproteinen gB, gC und gD des Pseudorabies Virus (PRV) zusätzlich jeweils das Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) exprimieren. Am Beispiel der PRV-Infektion der Maus konnte gezeigt werden, dass eine dreifache intramuskuläre Immunisierung mit den neuen Baculovirus-Rekombinanten die Tiere gegen eine letale Belastungsinfektion schützt. Die Ko-Expression des VSV G-Proteins führte zu einer verbesserten Induktion einer PRV-spezifischen, Th1-Typ-polarisierten Immunantwort.

GRABOWSKA *et al.* (2009) New baculovirus recombinants expressing Pseudorabies virus (PRV) glycoproteins protect mice against lethal challenge infection. *Vaccine* 27:3584-3591.

Department of Molecular Virology, Faculty of Biotechnology, University of Gdansk, Poland; Friedrich-Loeffler-Institut, Ifl

Aktive Immunisierung gegen Selbstantigene

Die aktive Immunisierung gegen Selbstantigen stellt eine besondere Herausforderung der Impfstoffentwicklung dar, da hier eine effektive Immunität ohne Induktion einer zerstörenden Autoimmunität erreicht werden muss. Diese Art der Immunisierung spielt heute eine wichtige Rolle bei der Immuntherapie von Tumorerkrankungen, kann aber auch wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Behandlung von Autoimmun- bzw. Infektionskrankheiten liefern. Eines der bestuntersuchten Selbstantigene, gegen das in den letzten Jahren versucht wurde eine Immunreaktion durch aktive Immunisierung zu erzeugen, ist das carcinoembryonische Antigen (CEA). CEA-transgene Mäuse weisen ein Expressionsmuster für CEA auf, das mit dem des Menschen vergleichbar ist. Mit Hilfe dieser CEA-transgenen Mäuse, denen subkutan CEA-exprimierende Tumorzellen implantiert werden, können wir untersuchen, ob eine aktive Immunisierung in der Lage ist, eine gegen das CEA gerichtete Immunität zu erzeugen, die das Tumorzellwachstum inhibiert ohne eine Autoimmunität gegen normales Gewebe zu erzeugen. Unter anderem haben wir in diesem Modell eine auf einem lentiviralen Vektorsystem basierende Vakzine getestet. Wir fanden, dass mit dieser Vakzine eine Stabilisierung von etablierten Tumoren erzielt werden konnte, ohne dass autoimmunbedingte Nebenwirkungen beobachtet werden konnten. Diese Untersuchungen zeigten, dass virale Vektoren geeignet sind, eine effiziente und sichere Immunantwort gegen Selbstantigene zu erzeugen.

LOISEL-MEYER *et al.* (2009). Potent induction of B and T cell immunity against human carcinoembryonic antigen-expressing tumors in human carcinoembryonic antigen transgenic mice mediated by direct lentivector injection. *Mol Cancer Ther* 8:692-702.

ZIMMERMANN, W. UND R. KAMMERER (2009). Carcinoembryonisches Antigen (CEA). In *Tumor-Associated Antigens* (eds. Gires and Seliger), Wiley-VCH, Weinheim, S. 201-218.

Friedrich-Loeffler-Institut, Ifl; LIFE Zentrum Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München (beide Deutschland); Ontario Cancer Institute and Toronto General Research Institute, University Health Network, Canada; Department of Medical Biophysics and Institute of Medical Sciences, University of Toronto, Canada; Experimental Transplantation and Immunology Branch and Medical Oncology Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland; Lentigen Corporation, Baltimore, Maryland

Optimierung des Expressionsniveaus und der Immunogenität von in Pflanzen exprimiertem VP60 des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus

In Pflanzen produzierte orale Impfstoffe, sogenannte „essbare Vakzinen“, werden als sichere, kostengünstig zu produzierende Impfstoffe angesehen. Probleme sind häufig das niedrige Expressionsniveau und/oder die geringe Immunogenität des Antigens. Am Beispiel des VP60, des Hauptstrukturproteins des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV), wurde daher versucht Methoden zu etablieren, die sowohl die Antigenmenge als auch die Immunogenität steigern. Die Anpassung des für VP60 kodierenden offenen Leserahmens an die Kodonnutzung von *Nicotiana tabacum* erbrachte eine erhebliche Steigerung der Proteinexpression in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen. Die Fusion von VP60 an die B Untereinheit des Cholera-Toxins ergab eine signifikante Verbesserung der Immunogenität. Mit den entsprechenden Konstrukten wurden transgene *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Brassica napus* und *Pisum sativum* generiert. Allerdings wurden die für die biologische Aktivität notwendigen CTB:VP60 Pentamerstrukturen nur in transgenen Tabak- und Erbsenpflanzen gefunden. Die Immunisierung von Kaninchen mit Extrakten aus den transgenen Erbsen führte zur Induktion von RHDV-spezifischen Antikörpern und zum Schutz vor Tod durch die nachfolgende Belastungsinfektion.

MIKSCHOFSKY *et al.* (2009). Cholera toxin B (CTB) is functional as an adjuvant for cytoplasmic proteins if directed to the endoplasmic reticulum (ER), but not to the cytoplasm of plants. *Plant Sci* 177:35-42.

MIKSCHOFSKY *et al.* (2009). Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus. *Plant Biotechnol J* 7:537-549.

MIKSCHOFSKY *et al.* (2009). Optimization of growth performance of freshly induced carrot suspensions concerning PMP production. *In-vitro Cell Dev Biol Plant* 45:740-749.

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IVD; Agrobiotechnologie, Universität Rostock, BioMath GmbH, (beide Rostock).

6.4 PATHOPHYSIOLOGIE

Equine Endometriose

Die Endometriose ist eine aktive oder inaktive periglanduläre und/oder stromale endometriale Fibrose einschließlich der glandulären Alterationen innerhalb der fibrotischen Areale. Ätiologie und Pathogenese dieser fertilitätsrelevanten, irreversiblen Erkrankung sind unklar, die Folge ist eine Veränderung des sekretorischen Proteinmusters, die zu einer Störung des intrauterinen Milieus führt und so einen embryonalen Früh Tod begünstigt.

Eine Charakterisierung unterschiedlicher Erscheinungsbilder der Endometriose sowie deren potenzieller Einflussfaktoren erfolgte mittels histomorphologischer, histochemischer und immunhistologischer Methoden. Die Befunde zeigen eine Abkopplung der fibrotischen Herde von uterinen Kontrollmechanismen. Eine metabolische Aktivierung der Fibrose kann durch eine Endometritis begünstigt werden, endokrine Variationen zeigen jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. Die verschiedenen Endometrioseformen sind als unterschiedliche, unabhängig ablaufende fibrotische Prozesse zu betrachten, die zu einer vollständigen Destruktion der Uterindrüsen mit nachfolgender Entwicklung einer Stromafibrose führen können.

Eine Charakterisierung endometrialer Sekretionsprodukte erfolgte mittels histochemischer und neu etablierter immunhistologischer Methoden an Endometriumbiopsien von drei gynäkologisch gesunden Stuten und von 48 Stuten mit unterschiedlichen Erscheinungsformen und Grad der Endometriose. Dabei wurden die Proteine Uteroglobulin, Uteroferrin, CalbindinD9k und Uterokalin sowie das Glykogen und die Proteoglykane dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass meist eine Zyklusasynchronizität des endometrialen Protein- und Kohlenhydratmusters auftritt, die im Vergleich zu unveränderten Uterindrüsen häufig mit einer schwächeren Reaktionsintensität einhergeht. Eine Ausnahme stellt das Uteroferrin dar, das auch innerhalb destrukturierender fibrotischer Herde häufig in einer intensiveren Expression zu beobachten ist. Einzelne basale Uterindrüsen weisen zudem das für das luminale Epithel typische Färbemuster der Proteoglykane auf. Diese Resultate werden als Hinweis für eine fertilitätsmindernde Beeinflussung des uterinen Mikromilieus im Rahmen der Endometriose interpretiert. Mit den hier vorgestellten neuen Methoden besteht nun die Möglichkeit, anhand einer Endometriumbiopsie eine morphologisch-funktionelle Beurteilung der uterinen Sekretion im Rahmen fertilitätsrelevanter Erkrankungen durchzuführen.

HOFFMANN *et al.* (2009). The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci* 111:261-78.

HOFFMANN *et al.* (2009) Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology* 71:264-74.

HOFFMANN *et al.* (2009). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Reaction patterns in the cycling mare. *Pferdeheilkunde* 25:189-284.

Friedrich-Loeffler-Institut, INNT; Institut für Veterinärpathologie, Universität Leipzig; Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig University Gießen (alle Deutschland). Department for Animal Science, Texas A&M University, USA

7 TIERSCHUTZ/ TIERHALTUNG

Voraussetzung für die Bewertung möglicher Belastungen durch die Haltungsformen ist das Verständnis der Mechanismen, mit denen sich die Tiere an ihre Haltung anpassen können. Berücksichtigt werden insbesondere Mechanismen der Verhaltenssteuerung (motivationale und kognitive Steuerungsmechanismen) sowie physiologische (stressphysiologische und immunologische) und molekulare Mechanismen. Gleichzeitig werden die Ansprüche der Nutztiere gegenüber der Haltungsumwelt im Hinblick auf Verhalten und Tiergesundheit untersucht. Dabei müssen auch Faktoren berücksichtigt werden, die die Anpassungsreaktionen der Tiere an die Haltungsbedingungen determinieren oder modifizieren. Hierzu gehören beispielsweise ontogenetische und Reifungsprozesse, genetische Faktoren, die Ernährung und der Gesundheitsstatus der Tiere.

Für eine objektivierbare Bewertung der Auswirkungen von Haltungsbedingungen auf die Tiere werden Indikatoren neu oder weiterentwickelt. Da sich die Haltung in komplexer Weise auf verschiedene Reaktionssysteme der Tiere auswirkt, müssen zur Interpretation der Auswirkungen meist mehrere Indikatoren herangezogen werden. Hierzu gehören Verhaltensäußerungen, physiologische, immunologische, molekularbiologische und pathologische Merkmale sowie Morbidität und Mortalität. Für die Bewertung von Haltungssystemen und -einrichtungen müssen die Indikatoren hinsichtlich ihrer Praktikabilität angepasst und innovative Indikatoren validiert werden.

Eine tiergerechte Haltung ermöglicht den Tieren die Ausübung wesentlicher Aspekte ihres Verhaltensrepertoires und schafft die Voraussetzungen sich erfolgreich mit der Haltungsumwelt auseinandersetzen zu können, ohne dass es zu Risiken für die Tiergesundheit kommt. Neben den Aspekten der Tiergerechtigkeit müssen weitere relevante Gesichtspunkte wie beispielsweise die Wirtschaftlichkeit, die Verfahrenssicherheit und der Umweltschutz einbezogen werden. Dies erfordert oft komplexe Forschungsansätze. Die enge Zusammenarbeit mit der Praxis stellt dabei eine wichtige Grundlage dar, um auftretende Probleme zu identifizieren, signifikante Haltungsfaktoren gezielt

und kurzfristig zu ermitteln und nachfolgend konkrete Lösungsansätze zu entwickeln.

Genetische Korrelationen zwischen Federpicken und Laufaktivität bei Legehennen

Federpicken ist ein zentrales Problem in der Haltung von Legehennen. Um dieses Problem besser untersuchen zu können, wurden Linien von Legehennen hinsichtlich ihrer Neigung zu Federpicken selektiert. In zwei Experimenten wurde die Laufaktivität von Küken dieser Linien untersucht. Die allgemeine Bewegungsaktivität wurde mit elektronischen Transpondern (RFID) erfasst. Insgesamt wurden 325 Hühner aus drei Linien untersucht: eine Kontroll-Linie (CON), eine auf geringe Federpickaktivität selektierte Linie (LFP) und eine auf hohe Federpickaktivität selektierte Linie (HFP). Die Laufaktivität der Tiere wurde im Alter von 13 bis 17 Wochen über Antennen in der Einstreu gemessen. Die Laufaktivität war bei HFP signifikant höher im Vergleich zu LFP und die Werte von CON lagen dazwischen (LSMeans: 0,72 vs 0,62 vs 0,57 je Huhn je Stunde). In einem zweiten Experiment wurde die Fortbewegung von 40 Küken der LFP- und der HFP-Linie im Alter von fünf Wochen zwischen 09:00 und 16:00 Uhr mit Hilfe eines sehr präzisen Computer-Tracking-Systems aufgezeichnet. Die zurückgelegte Strecke der Tiere der HFP-Linie war im Vergleich zu LFP deutlich höher (LSMeans: 122 vs 99 m pro Stunde). Diese Ergebnisse werden in Bezug auf die Ontogenese des Federpickens diskutiert und es wird ein neues Hyperaktivitäts-Modell für Federpicken vorgeschlagen.

KJAER, J.B. (2009). Feather Pecking in domestic Fowl is genetically related to locomotor activity levels: Implications for a hyperactivity disorder model of feather pecking. *Behav Genet* 39:564-570.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Corticosteron-Ausschüttung in auf Federpicken selektierten Legehennen

An Legehennen, die auf ihre Neigung zum Federpicken selektiert wurden, wurde die Plasmakonzentration von Corticosteron unter unbeeinflussten Bedingungen (Basalwerte), nach manueller Fixierung und nach Injektion von 1-24 ACTH (zur Provozierung der maximalen adrenalen Reaktion) gemessen. Die Tiere der drei Linien CON (unselektierte Kontrolllinie), LFP (auf geringe Federpickaktivität selektiert) und HFP (auf hohe Federpickaktivität selektiert) hatten vergleichbare Basalwerte von Corticosteron (1,6 ng/ml). Jedoch zeigten insgesamt die Hähne der drei Linien höhere Basalwerte als die Hennen (LSMeans: 1,9 bzw. 1,5 ng/ml). Nach manueller Fixierung für zehn Minuten zeigten HFP eine höhere Reaktivität als LFP (LSMeans: 11,0 bzw. 7,9 ng/ml), während die Werte der Kontrolle (CON) dazwischen lagen (10,2 ng/ml). Auch hier zeigten Hähne eine höhere Reaktivität als die Hennen (LSMeans: 11,2 bzw. 8,2 ng/ml). Bei Gabe von ACTH zeigten sich keine Unterschiede

zwischen den Linien (durchschnittlich 35,7 ng/ml). Hähne hatten höhere Werte nach ACTH-Gabe als Hennen (LSMeans: 41,3 bzw. 33,6 ng/ml). Die vorliegende Studie zeigt, dass die Selektion auf geringe Neigung zu Federpicken zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Stressoren wie manuelle Fixierung und Handling geführt hat. Unter Tierschutzaspekten ist dies ein positives Ergebnis.

KJAER, J.B. and D. GUEMENE (2009). Adrenal reactivity in lines of domestic fowl selected on feather pecking behavior. *Physiol Behav* 96:370-373.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT; INRA, UR83-Unité de Recherches Avicoles, Nouzilly, Frankreich

Analyse genetischer Mechanismen des Federpickens bei Legehennen

Obwohl Federpicken (FP) bei Legehennen während der letzten Jahrzehnte intensiv untersucht wurde, stellt dieses Verhalten immer noch ein Problem in der Haltung von Legehennen dar. Selektion gegen Federpicken ist möglich, aber um gegen FP auch in unterschiedlichen Populationen effizienter selektieren zu können, ist es notwendig, die diesem Verhalten zugrunde liegenden genetischen Mechanismen besser zu charakterisieren. In dieser Untersuchung wurde eine über acht Generationen auf hohe Neigung zu Federpicken selektierte Linie verwendet. Zum einen ergeben sich aus den Ergebnissen Hinweise auf ein dominantes Allel, das einen großen Effekt auf Federpicken hat. Dies lässt sich aus statistischen Berechnungen ableiten, in denen die beobachtete Häufigkeit von Federpicken über die acht Generationen der FP-Linie mit verschiedenen Annahmen für entsprechende Allelfrequenzen verglichen wurde. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass sich das Transkriptionsprofil der Gene besonders stark zu Federpicken neigender Hennen („Super-Peckers“) vom Profil der anderen Tiere der FP-Linie unterscheidet (456 von 14.077 untersuchten Genen). Zum anderen konnten Hinweise gefunden werden, dass es neben dem dominanten Allel vermutlich zusätzlich polygene Mechanismen gibt, die in das Federpicken involviert sind. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die selektierten Linien ein wertvolles Instrument bei der Charakterisierung der zugrunde liegenden komplexen genetischen Mechanismen des Federpickens sind.

LABOURIAU *et al.* (2009). Analysis of severe feather pecking behaviour in a high feather pecking selection line. *Poultry Sci* 88:2052-2062.

Aarhus University, Faculty of Agricultural Sciences, Tjele, Dänemark; Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Knochenfestigkeiten und Brustbeinstatus bei zwei verschiedenen Legelinien aus Kleingruppenhaltungen mit unterschiedlichen Sitzstangenpositionen und Gruppengrößen

Das Ziel der Studie war es, den Einfluss unterschiedlicher

Sitzstangenpositionen (hintere Stange erhöht (BE), vordere Stange erhöht (FE), beide Stangen erhöht (FBE)) und verschiedener Gruppengrößen auf Knochenfestigkeiten und Brustbeinstatus bei Legehennen aus Kleingruppenhaltung zu untersuchen. Humerus- und Tibiabruchofestigkeiten von LSL und LB Hennen aus ausgestalteten Käfigen (FC, 10, 20 Hennen) und zwei Kleingruppenhaltungen (SG 40-60; 40, 60 Hennen, SG 20-30; 20, 30 Hennen) mit verschiedenen Sitzstangenkonfigurationen wurden in zwei Durchgängen jeweils im 6. und 12. Legemonat vergleichend untersucht (insgesamt 576 Tiere). Wenn alle Abteile von SG 40-60 mit erhöhten Sitzstangen ausgestattet waren, konnten Humerus- und Tibiafestigkeiten im Vergleich zu FC signifikant gesteigert werden, wohingegen der Brustbeinstatus negativ beeinflusst wurde. Bezogen auf die Humerusfestigkeit erwiesen sich die Varianten BE und FE innerhalb SG 40-60 signifikant günstiger als FBE. LB Hennen zeigten signifikant höhere Knochenfestigkeiten in Abteilen mit 20 Hennen verglichen mit 30 Tieren, während für LSL Hennen kein entscheidender Einfluss der Gruppengröße auf die Knochenfestigkeit nachgewiesen wurde. Hennen in SG 40-60 mit modifizierten Sitzstangenpositionen erzielten gesteigerte Knochenfestigkeiten, wiesen jedoch gleichzeitig einen ungünstigeren Brustbeinstatus auf.

SCHOLZ *et al.* (2009). Bone strength and keel bone status of two layer strains kept in small group housing systems with different perch configurations and group sizes. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:249-256.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT; Institut für Tierzucht und Vererbungsforchung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, (beide Deutschland).

Einfluss der Einstreuart auf Prävalenz und Schweregrad von Pododermatitis bei männlichen Broilern

Der Einfluss von fünf verschiedenen Einstreuarten (Häckselstroh, Hobelspäne, Dinkelspelzen, Pelletinos, HygieneHolz-Späne) auf die Entwicklung von Pododermatitis und die Tierleistungen (Lebendmasse, Futteraufwand, Mortalität) von Broilern (Ross 308) wurde in zwei Versuchsdurchgängen untersucht. Pelletinos werden im Handel unter dem Namen Pelletino® Strohstreugranulat G angeboten. Bei HygieneHolz-Spänen handelt es sich um ein spezielles Produkt, das derzeit noch nicht auf dem Markt verfügbar ist.

Die männlichen Broiler wurden 35 Tage unter praxisüblichen Bedingungen (Fütterung, Lichtprogramm) gehalten.

Läsionen an den Fußballen konnten bereits zum ersten Beurteilungszeitpunkt am 7. Lebenstag beobachtet werden. Im Mittel beider Durchgänge wiesen die Broiler auf Häckselstroh den schlechtesten Score (1,54) auf. Tiere auf Pelletinos (0,38), gefolgt von HygieneHolz-Spänen (0,55), Hobelspänen (1,00) und Dinkelspelzen (1,03) hatten signifikant ($p < 0,0001$) geringere Läsionen. Die Gruppen auf Dinkelspelzen und Hobelspänen unterschieden sich nicht.

Im zweiten Versuchsdurchgang waren die durchschnittlichen Lebendmassen signifikant höher und der Futteraufwand niedriger. Zwischen den Versuchsdurchgängen wurden keine Differenzen in der Mortalität gefunden. In beiden Durchgängen wiesen die auf Pelletinos gehaltenen Broiler den geringsten Anteil Fußballenläsionen und die höchsten Lebendmassen am Versuchsende auf.

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

BERK, J. (2009). Einfluss der Einstreuart auf Prävalenz and Schweregrad von Pododermatitis bei männlichen Broilern. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:257-263.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Alternative Einstreuarten in der Aufzucht und Mast von Putenhennen und Putenhähnen

In kommerziellen Putenbeständen werden häufig Veränderungen im Bereich der Fuß- und Zehenballen beobachtet, die unter dem Begriff Pododermatitis (Fußballendermatitis) zusammengefasst werden. Die Ursachen für das Vorkommen von Pododermatitis scheinen multifaktoriell zu sein, wobei zwischen internen (Genetik, Geschlecht, Tialter, Lebendmasse, Gesundheitszustand) und externen (Lichtmanagement, Einstreumaterial, Besatzdichte, Einstreufeuchte, Futterzusammensetzung, Jahreszeit) Faktoren unterschieden wird.

In Deutschland werden in der Praxis am häufigsten Hobelspäne in der Aufzuchtphase und anschließend Häckselstroh in der Putenmast eingesetzt. Zielstellung der an unserem Institut durchgeführten Untersuchungen war es, neben praxisüblichen Varianten auch alternative Einstreuarten im Hinblick auf die Tierleistungen und die Tiergesundheit mit besonderem Schwerpunkt auf das Vorkommen und den Schweregrad von Pododermatitis bei männlichen und weiblichen Puten zu untersuchen.

In zwei Versuchsdurchgängen mit insgesamt 2.040 weiblichen Puten (BUT Big 6) wurden in der Aufzuchtperiode (1. bis 6. Lebenswoche) zunächst sechs Gruppen auf Hobelspänen und sechs auf Lignocellulose eingestallt. Mit Beginn der Mastperiode (7. bis 16. Lebenswoche) wurden die Tiere weiterhin auf Lignocellulose bzw. Hobelspänen gehalten oder es erfolgte ein entsprechender Wechsel der Einstreu von Hobelspänen zu Häckselstroh, Lignocellulose zu Hobelspänen und Lignocellulose zu Häckselstroh.

Unabhängig von der Einstreuvariante fanden wir einen Anstieg in der Prävalenz und dem Schweregrad der Pododermatitis mit zunehmendem Tialter. Die Bewertung der Fußballen zeigte, dass der Schweregrad der Läsionen in Abhängigkeit von der verwandten Einstreu signifikant differierte. Putenhennen, die über den gesamten Zeitraum

bzw. nur während der Aufzuchtphase auf Lignocellulose gehalten wurden, konnten häufiger mit der Note 0 (keine Läsionen) bewertet werden als die Einstreuvarianten mit Hobelspänen bzw. Wechsel von Hobelspänen zu Häckselstroh. Im Mittel beider Durchgänge waren die Lebendmassen der Tiere, die auf Hobelspänen mit Wechsel zu Häckselstroh gehalten wurden, am geringsten. Hennen, die die gesamte Mast oder nur während der ersten sechs Wochen auf Lignocellulose gehalten wurden, erreichten höhere Lebendmassen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Tierleistungen sowie die Prävalenz und der Schweregrad von Pododermatitis durch die Art der Einstreu beeinflusst werden kann. Aus Sicht der Tiergesundheit scheint die neue alternative Einstreuart Lignocellulose einen positiven Einfluss auf das Vorkommen und den Schweregrad von Pododermatitis bei Putenhennen auszuüben.

Mit Putenhähnen wurden ebenfalls zwei Versuchsdurchgänge (1.224 Hähne, Big 6) mit drei Einstreuarten bis zur 6. LW (Hobelspäne, Lignocellulose, Pelletinos) durchgeführt. Nach der 6. LW wurde nur noch Häckselstroh eingesetzt, das mittels einer Strohmaschine erzeugt wurde und daher über eine bessere Saugfähigkeit im Vergleich zu herkömmlichem Häckselstroh verfügt. Wir fanden keinen nachhaltigen Einfluss der unterschiedlichen Einstreuarten während der Aufzuchtphase auf die Tierleistungen. Anzahl und Schweregrad der Pododermatitis erhöhten sich ebenso wie bei den Putenhennen mit zunehmendem Lebensalter. Es wurden keine signifikanten Effekte der Einstreuart bezogen auf Pododermatitis gefunden, während Mortalität und Lebendgewicht durch den Versuchsdurchgang beeinflusst wurden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verwendung unterschiedlicher Einstreuarten nur in der Aufzuchtphase keinen nachhaltigen Effekt auf den Schweregrad und das Vorkommen von Pododermatitis und die Tierleistungen in der Untersuchung hatte. Es scheint, dass durch die Verwendung von modifiziertem Häckselstroh mit erhöhter Saugfähigkeit eine Verbesserung der Fußballengesundheit möglich ist.

BERK, J. (2009). Effekte der Einstreuart auf Tiergesundheit und Tierleistungen bei Putenhennen. In: Praxis trifft Forschung, Neues aus der ökologischen Tierhaltung.

RAHMANN G, SCHUMACHER U. (Hrsg.) vTI-Sonderheft 332:23-29.

Berk, J. (2009). Bessere Fußballen, weniger Arbeit. Land & Forst 25, 32-35.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Einflüsse der kalten Jahreszeit auf die Körpertemperatur von im Offenstall gehaltenen Straußen (*Struthio camelus*)

Die Zucht und Haltung von Straußen im nördlichen Europa wird immer noch sehr kontrovers diskutiert.

Während dieser Studie wurden daher bei zwölf Straußen zweier verschiedener Altersgruppen Temperatur-Daten-

Logger ins Abdomen und unter die Haut implantiert, um über einen Zeitraum von zwölf Wochen die Körpertemperatur in diesen Regionen zu erfassen. Die mittlere Temperatur im Peritoneum schwankte bei jüngeren Tieren zwischen 37,4°C und 38,5°C und bei den älteren zwischen 37,2°C und 38,1°C. Die Körpertemperatur der Tiere wurde signifikant von den klimatischen Bedingungen beeinflusst. Allerdings sind diese Effekte gering im Vergleich mit den Variationen, die zwischen und innerhalb der Tiergruppen auftreten. Daher lassen die Ergebnisse den Rückschluss zu, dass junge Strauße in der Lage sind, sich an die klimatischen Bedingungen, die während unserer Studie herrschten, zu adaptieren.

SCHRADER, L., K. FUHRER, and S. PETOW. (2009). Body temperature of ostriches (*Struthio camelus*) kept in an open stable during winter time in Germany. J Therm Biol 34:366-371.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Auswirkungen einer frühen Kontaktmöglichkeit zwischen wurffremden Ferkeln und den damit verbundenen Haltungsbedingungen auf Sozialverhalten und Lebendmasseentwicklung

An 1.935 abgesetzten Ferkeln (113 Sauen, 230 Würfe) wurden die Auswirkungen eines frühen Kontaktes zwischen wurffremden Ferkeln während der Säugezeit auf deren Sozialverhalten, Hautverletzungen und Lebendmasseentwicklung untersucht. Als Abferkelssysteme standen für jeweils acht Sauen samt Würfen eine Gruppenabferkelung (GH), freie Abferkelbuchten vom Typ FAT2 (LH) sowie konventionelle Abferkelbuchten mit Ferkelschutzkorb (FC) zur Verfügung. Eine Ferkeltür zwischen jeweils zwei benachbarten Abferkelbuchten (Kastenstandabferkelung, FC+ bzw. Bewegungsbucht FAT2, LH+) wurde ab dem 10. Lebenstag geöffnet, die Hälfte der Einzelabferkelungen blieb ohne Kontaktmöglichkeit (FC- bzw. LH-). In der Gruppenabferkelung wurden die Ferkelbarrieren ebenfalls am 10. Tag p.p. entfernt, so dass die Ferkel Zugang zum gesamten Bereich hatten.

Nach dem Absetzen am 28. Tag verblieben die Ferkel in ihrer jeweiligen Abferkelbucht und wurden mit 32 Tagen in 20-er Koomansbuchten eingestallt. Dabei wurden Tiere der Kontaktgruppen FC+ und LH+ in ihrer gewohnten Gruppe, aus den Systemen GH, FC- und LH- wurfweise etwa 20 Tiere zusammengestellt.

Das Integument aller Ferkel wurde jeweils vier Tage vor und vier Tage nach dem Öffnen der Ferkeltüren, unmittelbar vor dem Umstallen sowie vier Tage danach auf Hautverletzungen bonitiert. Die Verhaltensweisen Beißen, Kämpfen, Trinken und Liegen wurden in den Aufzuchtbuchten innerhalb eines Zeitraumes von 48 Stunden ab dem Umstallen für 2 x 4 Stunden mittels Direktbeobachtungen erfasst.

Die verschiedenen Haltungsverfahren beeinflussten weder die Anzahl und Schwere der Hautverletzungen während der Säugeperiode (H = 8,72, FG 4, ns) noch die tägliche Lebendmassezunahme bis zum Absetzen (F4,216 = 1,21, ns).

Bei Tieren aus den Kontaktgruppen (FC+, LH+ und GS) konnte signifikant weniger agonistisches Verhalten (Kämpfen und Beißen) beobachtet werden als bei den Kontrolltieren ($H = 53,36$, FG 4, $P < 0,0001$). Vier Tage nach dem Umställen wiesen die Kontrollferkel signifikant häufiger Hautverletzungen auf als die Kontaktferkel. Des Weiteren zeigten Ferkel aus den Bewegungsbuchten weniger Hautverletzungen als die Tiere aus den konventionellen Abferkelständen ohne Einstreu ($H = 33,86$, FG 4, $P < 0,0001$).

Die Latenzzeit bis zum ersten Liegen der kompletten Aufzuchtgruppe verringerte sich mit steigendem Platzangebot und höherer Strukturierung des vorherigen Abferkelsystems ($F_{4,93} = 25,76$, $P < 0,001$), wohingegen sich die Latenz bis zum ersten Trinken vergrößerte ($F_{4,81} = 3,43$, $P = 0,01$). Die eventuelle vorherige Kontaktmöglichkeit beeinflusste diese nicht.

Fünf Wochen nach dem Absetzen wiesen Tiere aus den Kontaktsystemen höhere Lebendmassezunahmen ($F_{4,204} = 7,01$, $P < 0,0001$) sowie insgesamt höhere Lebendmassen ($F_{4,207} = 5,34$, $P < 0,001$) auf als Tiere aus den Kontrollsystemen ohne Kontaktmöglichkeiten.

Der frühe Kontakt zwischen wurffremden Ferkeln während der Säugezeit mittels einer Ferkeltür kann den Stress beim Absetzen und Umställen für die Ferkel mildern und hat positive Auswirkungen auf die Lebendmasseentwicklung während der Aufzucht.

Abferkelbuchten mit Einstreu und einem größeren Platzangebot wie in den FAT2 Buchten und der Gruppenabferkelung können ebenfalls die Anzahl agonistischer Auseinandersetzungen reduzieren und die Ferkel besser auf ihre neue Haltungsumgebung vorbereiten.

KUTZER *et al.* (2009). Effects of early contact between non-littermate piglets and of the complexity of farrowing conditions on social behaviour and weight gain. *Appl Anim Behav Sci* 121:16-24.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

Stresserkennung bei Ferkeln unter landwirtschaftlichen Haltungsbedingungen durch Klassifikation von Lauttypen

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die Analyse von hochfrequenten Stresslauten bei Schweinen eingesetzt werden kann, um das Wohlergehen der Tiere zu bewerten. Im Mittelpunkt unserer Untersuchung steht die Klassifikation von drei unterschiedlichen Lautäußerungen der Ferkel: Grunzen, Quieken und Schreien.

In einem Kastrationsexperiment (Versuch 1) wurden 3.285 Lautäußerungen von 42 Ferkeln hinsichtlich 21 verschiedener Lautmerkmale analysiert. Eine erste Diskriminanzfunktion für die drei Lauttypen konnte aus Lautaufnahmen unter laborähnlichen Bedingungen abgeleitet werden. Für die zweite Klassifikation wurden neue Lauteigenschaften definiert, die nicht kalibrierte Messwerte zu den relativen Energiegehalten der Lauttypen enthalten. Diese zwei Klassi-

fikationen ergaben zu 86,7 % eine identische Zuordnung der Laute zu den drei Lauttypen. Diese zweite Klassifikation erlaubt Lautanalysen an frei beweglichen Tieren unter praxisnahen Aufnahme- und Haltungsbedingungen.

Diese Technik wurde bei einem Open-Field-Experiment mit Ferkeln aus zwei verschiedenen Abferkelsystemen (Versuch 2) validiert. Es wurden 11.089 Lautäußerungen von 22 Ferkeln untersucht. Die Anzahl der Schreilaute war bei Ferkeln aus der Gruppenabferkelung (Sozialkontakt zu anderen Sauen und anderen Ferkeln ab dem 10. Lebenstag) geringer als bei Ferkeln aus Einzelabferkelungssystemen. Es gab Unterschiede in den Lauteigenschaften sowohl innerhalb der Versuche als auch zwischen den beiden Untersuchungen. Die Vokalisation von Ferkeln aus dem Einzelabferkelungssystem und Gruppenabferkelungssystem unterschieden sich signifikant in Dauer, Energiegehalt sowie relativem Maximumlevel. Die Lauttypenanalyse kann nicht nur helfen, schmerzanzeigende Lautäußerungen während der Kastration zu ermitteln, sondern sie kann auch eingesetzt werden, um z. B. Stress durch Separation während eines Open Field-Testes deutlich zu machen. Deshalb kann die Klassifikation von Lauttypen bei Untersuchungen, die die Lautäußerungen von Schweinen zur Einschätzung des Wohlergehens der Tiere benutzen, wertvolle Informationen geben.

VON BORELL *et al.* (2009). Vocal-type classification as a tool to identify stress in piglets under on-farm conditions. *Animal Welfare* 18:407-416.

Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Martin-Luther-University, Halle-Wittenberg; Friedrich-Loeffler-Institut, ITT, (beide Deutschland)

Mastbullen – Einfluss von Boden und Besatzdichte auf Schwanzspitzen- und Karpalgelenksverletzungen

In Gruppenhaltungen mit sieben Mastbullen je Bucht und bei Besatzdichten zwischen 2,5 bis 5,0 m²/Tier wurde der Einfluss von harter und weicherer Spaltenbodenqualität auf Tiergesundheit und Verhalten untersucht. Es wurden konventioneller Betonspaltenboden und Gummimatten für Spaltenböden (LOSPA, Fa. Kraiburg) verglichen. Der Einsatz von Gummimatten führte zu einer deutlichen Reduzierung schwerer, trittbedingter Schwanzspitzenverletzungen und einer geringeren Belastung der Karpalgelenke beim Abliegen. Auf Beton zeigten die Gelenke bereits frühzeitig Alterationen der belasteten Hautareale, bei denen sich histologisch eine adaptative epidermale Proliferation nachweisen ließ. Verhaltensuntersuchungen bestätigten, dass auf Beton nur die Hälfte aller Aufsteh- und Abliegevorgänge normal waren. Im Vergleich zu Bullen auf gummierten Böden hatten die Bullen aus allen Betonbodenbuchten weniger (< 10/d), aber dafür deutlich längere Liegeperioden (> 1,5 Stunden). Dies zeigt, dass Bullen auf harten Böden einen häufigen Wechsel zwischen Stehen und Liegen meiden und gummierte Liegeflächen – wie sie in der Milchkuhhaltung

bereits Stand der Technik sind – standardmäßig auch für Mastbullenhaltungen zu empfehlen sind. Weitere Untersuchungen z. B. zur Klauengesundheit helfen, den Einfluss von Boden und Besatzdichte auf die Tiergerechtigkeit des Haltungssystems noch umfassender zu analysieren.

ZERBE *et al.* (2009) Fattening bulls – floor type and stocking density effects on tail tip and carpal injuries. XIV ISAH congress 2009, Sustainable Animal Husbandry: Prevention is Better than Cure, Proc. 14th Intern. Cong. Intern. Soc. for Animal Hygiene, 19.-23. Jul.09, Hannover, 375-378.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITT

8 TIERERNÄHRUNG

8.1 FUTTERMITTELZUSATZSTOFFE

8.1.1 Spurenelemente

In der Tierernährung werden als Spurenelemente lebensnotwendige (essentielle) anorganische Bestandteile sowohl im Futter als auch im Tierkörper bezeichnet, deren Konzentration meist unter 100 mg je kg Trockensubstanz (T) liegt. Es wird in klassische Spurenelemente, wie Fe, Mn, Zn, Cu, Se, J, Mo, Cr und F und neue oder Ultra-Spurenelemente unterschieden (z. B. Al, As, B, Ba, Br, Cd, Cs, Li, Ni, Pb, Rb, Si, Sn, V). Einzelne Spurenelemente (z. B. Cu, Zn, Seltene Erden wie Ce, La) lösen in höheren Dosierungen Sondereffekte aus, viele können in hohen Dosierungen aber auch toxisch wirken (z. B. As, Cd, Cu, F, Mo, Pb).

Neben der Sicherung einer bedarfsgerechten Spurenelementversorgung der Tiere haben insbesondere Fragen zur Bewertung der Sicherheit und Umweltrelevanz von Spurenelementen (insbesondere Kupfer, Zink und Jod) bei der Verwendung als Futterzusatzstoff in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung in der Tierernährung erlangt.

Auch Fragen bezüglich der am besten geeigneten Diagnosemöglichkeiten der Spurenelementversorgung (Mangel und Überschuss) müssen dabei in die Überlegungen mit einbezogen werden.

8.1.1.1 JOD

Das Spurenelement Jod ist für Mensch und Tier essentiell. Jod wird im Organismus für die Synthese der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T_3) und Tetrajodthyronin (T_4) benötigt, welche bedeutende metabolische Prozesse wie Wachstum, Reproduktion und Gehirnentwicklung steuern. Sowohl eine Unter- als auch eine Überversorgung mit Jod wirken sich negativ auf die Gesundheit aus. Neben der Salzzodierung wird in den letzten Jahren verstärkt versucht, Lebensmittel tierischer

Herkunft (Fleisch, Milch, Eier) über die Supplementation von Futtermitteln mit Jod anzureichern. Dies birgt aber auch ein hohes Risiko einer Überdosierung, da der „Tolerable Upper Intake Level“ (500µg/d) beim Menschen nur etwa dreimal über dem täglichen Jod-Bedarf (180-200µg/d) liegt.

Untersuchungen zur Anreicherung von Jod im Lebensmittel Milch durch Supplementierungen von Jod über das Futter von Milchkühen

In verschiedenen Dosis-Wirkungsversuchen wurde der Einfluss einer Supplementation bis zur erlaubten Höchstmenge von 5 mg Jod/kg Futter sowie der Effekt verschiedener Jodquellen untersucht.

In einer Studie mit fünf Milchkühen der Rasse Dt. Holstein pro Gruppe konnte gezeigt werden, dass eine höhere Jodsupplementierung (0,2; 1,3; 5,1 und 10,1 mg Jod/kg Futtertrockensubstanz, T) in signifikant höheren Jodkonzentrationen in Milch und Blutserum resultierte. Dabei wurden 30 - 40 % der mit dem Futter aufgenommenen Jodmenge in die Milch eingelagert. Eine Jodsupplementierung von 0,5 - 1,5 mg/kg Futtertrockensubstanz, die bedarfsdeckend für die Milchkuh sind, führte bereits zu einer Jodkonzentration in der Milch von 100 - 300 µg Jod/l Milch, welche den täglichen Jodbedarf des Menschen deckt.

In einer zweiten Studie wurden 32 Kühe, unterteilt in vier Gruppen mit jeweils acht Tieren, untersucht. Als Proteinquelle erhielten die Hälfte der Tiere getrocknete Getreideschlempe (DDGS, ohne Glucosinolate), die andere Hälfte Rapsextraktionsschrot (RSM, 3,5µmol Glucosinolate/g). Von den so versorgten Tieren erhielten jeweils die Hälfte in aufeinander folgenden 21tägigen Versuchsperioden Natriumjodid- oder Calciumjodatzulagen in Höhe von 0; 0,5; 1; 2; 3; 4 und 5 mg/kg Trockenmasse. Mit steigender Jodzulage erhöhte sich erneut die Jodkonzentration in der Milch, wobei die Werte bei den mit RSM gefütterten Tieren um 50 bis 70 % niedriger als bei den mit DDGS versorgten Kühen lagen. Die Verwendung von Calciumjodat führte zu höheren Jodkonzentrationen in der Milch. Bei der höchsten untersuchten Zulage (5 mg/kg Trockenmasse) stieg die Jodkonzentration in der Milch bei Fütterung von DDGS auf 1.464 µg/kg (Jodid) und 1.578 µg/kg (Jodat) und bei RSM als Proteinquelle auf 718 µg/kg (Jodid) und 620 µg/kg (Jodat). Beide Studien zeigen deutlich, dass die gegenwärtig erlaubte Höchstmenge von Jod im Futter von Milchkühen zu Jodkonzentrationen in der Milch führt, die in einer Überversorgung des Menschen resultieren können. Deshalb sollte die erlaubte Höchstmenge von Jod im Futter von Kühen erneut überprüft werden, wobei der Effekt von glucosinolathaltigen Futtermitteln zu beachten ist.

SCHÖNE *et al.* (2009). Iodine concentration of milk in a dose-response study with dairy cows and implications for consumer iodine intake. *J Trace Elements Med Biol* 23:84-92.

FRANKE *et al.* (2009). Influence of various iodine supplementation levels and two different iodine species on the iodine content of

the milk of cows fed rapeseed meal or distillers dried grains with solubles as the protein source. *J Dairy Sci* 92:4514-4523.

FRANKE *et al.* (2009). Effect of various iodine supplementations, rapeseed meal application and two different iodine species on the iodine status and iodine excretion of dairy cows. *Livestock Sci* 125:223-231.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Arbeitsgruppe Analytik, Max Rubner-Institut, Kulmbach; Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Tierärztliche Hochschule, Hannover; Thüringische Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena (alle Deutschland).

8.1.2 Vitamine

Die Vitamine der B-Gruppe zählen zu den wasserlöslichen Vitaminen. Zu den B-Vitaminen gehören Thiamin (B₁), Riboflavin (B₂), Pyridoxin (B₆), Cobalamin (B₁₂), Biotin, Folsäure, Niacin und Pantothenensäure. Die Zusammenfassung dieser Vitamine in einer Gruppe ist allerdings ausschließlich historisch bedingt und spiegelt nicht deren sehr unterschiedliche Strukturen und metabolische Funktionen wider. Ein gemeinsames Merkmal aller B-Vitamine ist jedoch, dass alle wichtige Coenzym-Funktionen im Stoffwechsel besitzen. Sie sind also essentiell für Leistung und Gesundheit bei Mensch und Tier.

Dem Wiederkäuer steht neben dem Futter noch eine weitere B-Vitamin-Quelle zur Verfügung, da die Mikroorganismen im Pansen diese synthetisieren können. Die mikrobielle Vitamin-Synthese wird bisher als für die Kuh bedarfsdeckend angenommen. Allerdings ist wenig über eventuelle Einflüsse auf die Syntheseleistung bekannt.

8.1.2.1 NIACIN IN DER MILCHVIEHFÜTTERUNG

Niacin kann durch Pansenmikroorganismen synthetisiert, genutzt und abgebaut werden, wobei davon ausgegangen wird, dass die mikrobielle Synthese die Hauptquelle für die Niacinversorgung des Wiederkäuers darstellt. Da jedoch Rationen mit unterschiedlichem Grundfutter/Kraftfutter-(GF:KF) Verhältnis zu einer Änderung der bakteriellen Population im Pansen führen, könnte dies auch den Abbau und die Synthese von Niacin im Pansen und damit den Stoffwechsel der Tiere beeinflussen.

Einfluss unterschiedlicher Niacin-Supplementationen auf verschiedene Blut- und Milchwerte von Milchkühen

Das Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Einflüsse einer Niacinzulage zu drei Rationen mit unterschiedlichem GF:KF-Verhältnis auf Blut- und Milchparameter zu untersuchen. Eine Niacinzulage führte zu erhöhten Glucose-, Harnstoff- und Niacin- (Nicotinamid) Konzentrationen im Blutserum, erhöhte jedoch nicht die Niacinmenge, die mit der Milch

ausgeschieden wurde. Die Milchfettzusammensetzung wurde durch die Niacin-Zulage derart beeinflusst, dass der Anteil an Ölsäure anstieg. Die Nicotinamidgehalte in der Milch wurden mit zunehmendem Konzentratanteil in der Ration erhöht.

NIEHOFF *et al.* (2009). Investigations on the effect of a niacin supplementation to three diets differing in forage-to-concentrate ratio on several blood and milk variables of dairy cows. *Arch Anim Nutr* 63:203-218.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE

8.1.3 Nicht lebensnotwendige Futtermittelzusatzstoffe

Einfluss von Zeolith A auf Futteraufnahme, Mineralstoffwechsel, Energieversorgung und Nährstoffverdaulichkeit bei Milchkühen

Die Gebärdparese (Milchfieber) stellt eine bedeutende Stoffwechselerkrankung bei hochleistenden Milchkühen dar. Dabei handelt es sich um eine akute Störung des Kalziumstoffwechsels, die in der Regel kurz nach dem Kalben auftritt. Prädisponiert sind vor allem Hochleistungskühe ab der 3. Laktation. Die Inzidenz liegt weltweit bei 5 bis 10 % aller adulten Milchkühe. Bereits eine subklinische Hypokalzämie (Serum-Ca < 2 mmol/l) kann negative Auswirkungen auf verschiedene physiologische Funktionen haben. Daher gibt es verschiedene Möglichkeiten, über Futterzusatzstoffe prophylaktisch dieser Erkrankung entgegenzuwirken (z.B. Ca-arme Fütterung, Saure Salze, Zeolith A). Alle diese Prophylaxestrategien haben Vor- und Nachteile, die es abzuwägen gilt, um letztlich für jeden Betrieb die am besten geeignete Strategie zu finden.

Zeolith A ist in der EU für den speziellen Ernährungszweck „Reduzierung des Milchfiebrisrisikos“ mit einer Maximaldosierung von 500 g Zeolith A pro Tier und Tag zugelassen. Neben der absoluten Zeolith A-Dosierung muss aber auch das Zeolith A/Kalzium-Verhältnis der Ration berücksichtigt werden; bei hohen Kalziumgehalten in der Ration müssen höhere Zeolithmengen ergänzt werden, um eine sichere Prophylaxe zu erreichen. Dabei können hohe Zeolithdosierungen allerdings unerwünschte Nebenwirkungen, wie eine Reduzierung der Futteraufnahme, verminderte Energieversorgung oder Hypophosphatämie, hervorrufen. Daher liegt die zu empfehlende Zeolith A-Dosierung, bei der die gewünschten Wirkungen in Verbindung mit möglichst geringen Nebenwirkungen erreicht werden, bei 20 - 30 g Zeolith A/kg Futtertrockensubstanz. Dies entspricht etwa einer Dosierung von 200 - 300 g Zeolith A pro Tier und Tag.

GRABHERR *et al.* (2009). Effect of several doses of zeolite A on rumen fermentation and phosphorus metabolism in dairy cows. *Arch Anim Nutr* 63:321-336.

GRABHERR *et al.* (2009). Effect of several doses of zeolite A on feed intake, energy metabolism and on mineral metabolism in dairy cows around calving. *J Anim Physiol Anim Nutr* 93:221-236.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig; FOOD GmbH Analytic Consulting, Jena (alle Deutschland).

Nicht-Stärke-Polysaccharid (NSP)-spaltende Enzyme und Spulwurmbefall bei Junghennen

Auslauf- und Bodenhaltung von Hühnern sind mit einer höheren Prävalenz von Endoparasitosen, wie z. B. mit dem Befall durch den Hühnerspulwurm (*Ascaridia galli*), assoziiert. Daher stellte sich die Frage, inwiefern über die Fütterung Einfluss auf den Spulwurmbefall von Junghennen genommen werden kann. Dazu wurde eine Futtermischung, die höhere Anteile an löslichen NSP enthielt, als Basaldiät verwendet. Diese löslichen NSP führen bei wachsendem Geflügel zu einem Anstieg der Viskosität der Ingesta des Dünndarms, was mit Maldigestion und Malabsorption einhergeht. Dieser Effekt kann durch den Zusatz von NSP-spaltenden Enzymen zum Futter neutralisiert werden. Beide Fütterungsvarianten (ohne und mit Zusatz von NSP-spaltendem Enzym) wurden an nicht-infizierten und mit *A. galli* infizierten Junghennen getestet.

Es zeigte sich, dass der Wurmbefall einerseits die intestinale Viskosität reduzierte und dass andererseits eine Infektion unter den Bedingungen einer geringen intestinalen Viskosität mit einer verringerten Ausscheidung an Parasiteneiern assoziiert war. Obwohl der Wurmbefall die Darmmorphologie beeinflusste, war die Nährstoffretention nicht beeinflusst. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu prüfen, ob eine Fütterung, die eine niedrige intestinale Viskosität erzeugt, unter Praxisbedingungen die Ausscheidung von Parasiteneiern reduziert und die Epidemiologie des Spulwurmbefalls von Hühnern beeinflusst.

DÄNICKE *et al.* (2009). *Ascaridia galli* infection of pullets and intestinal viscosity: consequences for nutrient retention and gut morphology. *Brit Poult Sci* 50:512-520.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Produktionssysteme der Nutztierhaltung, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Universität Göttingen; Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, (alle Deutschland).

Algen als alternative Futtermittel – Einfluss der Mikroalge *Chlorella vulgaris* auf die Leistungsmerkmale von Hennen

Chlorella vulgaris, eine natürlich vorkommende Grünalge, wurde kultiviert und findet in der Industrie und in der Ernährung immer mehr Beachtung. Ihre Inhaltsstoffe sollen die tierische Leistung und Gesundheit einschließlich der Reproduktion und Eiqualität positiv beeinflussen. In dem jetzigen Versuch wurden zwei technologisch unterschiedlich behandelte Algen (sprühgetrocknet = SD; auf Kugelmöhlen gemahlen und dann sprühgetrocknet = BM-SD) dem Futter

zugegeben. Der Einfluss einer Supplementierung von 0/2,5/5,0/7,5 g *C. vulgaris* wurde in einem Langzeitversuch an Hennen (8 Legemonate) und in zwei kurzfristigen N-Stoffwechselversuchen untersucht. Neben den Legeleistungsmerkmalen wurden zweimalig Eier gebrütet und die Eizusammensetzung ermittelt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Supplementierung mit der grünen Mikroalge *C. vulgaris* insbesondere am Beginn der Legeperiode die Anzahl und die Qualität der Eier sowie das Brutergebnis positiv beeinflusst. Kein nachteiliger Effekt der Mikroalge auf die Gesundheit der Hennen oder den Proteinansatz wurde festgestellt. Beide Herstellungsformen der *C. vulgaris* (sprühgetrocknet; auf Kugelmöhlen gemahlen und dann sprühgetrocknet) sind deshalb als Futterzusatzstoff für Legehennen geeignet.

HALLE *et al.* (2009). Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on laying hen performance. *Arch Zootech* 12:5-13.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Institut für Veterinärmedizin, Fakultät für Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin; Forschungsbereich Genetik und Biometrie und Forschungsbereich Ernährungsphysiologie „Oskar Kellner“, Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf, (alle Deutschland).

8.2 MYKOTOXINE

Als Mykotoxine werden Stoffwechselprodukte des Sekundärstoffwechsels von Schimmelpilzen bezeichnet, die bei höheren Organismen in geringsten Mengen zu Vergiftungserscheinungen führen können. Aus Sicht der Tierernährung kommt einigen Mykotoxinen der Schimmelpilzgattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* eine besondere Bedeutung zu, da sie in Konzentrationen in Futtermitteln vorkommen können, die bei landwirtschaftlichen Nutztieren Intoxikationen hervorrufen können. Als Beispiele seien Aflatoxin B1, das u. a. von *A. flavus* gebildet wird und das aufgrund seiner Toxizität und seines Rückstandsverhaltens mit Höchstgehalten für Futtermittel belegt ist, sowie Deoxynivalenol und Zearalenon, die u. a. von *F. graminearum* und *F. culmorum* synthetisiert werden und aufgrund ihres negativen Effektes auf die Tiergesundheit bei vernachlässigbarem Carry-over-Verhalten mit Richtwerten für kritische Konzentrationen in Futtermitteln bedacht wurden, genannt. Aber auch die Alkaloide, die vom Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* gebildet werden, gehören in die Gruppe der Mykotoxine.

Unter den *Fusarium*-Mykotoxinen sind insbesondere DON und ZON von Bedeutung, da sie bereits auf dem Feld vor der Ernte gebildet werden und trotz pflanzenbaulicher Minimierungsstrategien infolge des Witterungseinflusses häufiger vorkommen können.

Unter den Nutztieren ist insbesondere das Schwein empfindlich, das auf höhere Konzentrationen an DON mit einem Futterverzehrückgang und an ZON mit

Hyperöstrogenismus und Fertilitätsstörungen reagiert. Wiederkäuer und Geflügel werden als weniger empfindlich angesehen.

Molekulare Mechanismen der toxischen Wirkung von DON

Die Untersuchungen dieses Projektes zeigten, dass DON die Zytokinexpression immunkompetenter Zellen des Schweins beeinflusst. Porzine alveolare Makrophagen reagierten durch eine Erhöhung der mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1 β und/oder des Tumor Nekrose Faktors (TNF)- α und des entzündungshemmenden Zytokins IL-10, wenn sie mit oder ohne zusätzlichen inflammatorischen Stimulus durch Lipopolysaccharide (LPS) mit 500 nM DON inkubiert wurden. Ähnliche Effekte von DON und LPS auf TNF- α und IL-10 konnten an porzinen Leberzellkulturen, die Kupffer-Zellen (residente Makrophagen der Leber) enthielten, gezeigt werden. Die parallel zu den immunmodulatorischen Effekten beobachtete Reduktion der totalen Proteinsynthese und speziell der Albuminsekretion der Leberzellkulturen schien dabei eher auf der Hemmung der Proteinsynthese durch DON zu beruhen als auf der Regulation durch die Zytokine. Döll et al. (2009). Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages. *Toxicol Lett* 184:97-106.

Döll et al. (2009). Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytokine excretion and mRNA expression in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. *Toxicol Lett* 190:96-105.

Döll et al. (2009). Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytotoxicity protein synthesis and metabolism of DON in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. *Toxicol Lett* 189:121-129.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Abteilung für veterinärmedizinische Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Utrecht, Niederlande.

Entgiftung von DON-kontaminiertem Triticale

Es wurde die Effektivität einer Feuchtkonservierung von DON-kontaminiertem Triticale mit Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, SBS), Propionsäure (PA) und verschiedenen Kombinationen beider Substanzen auf die Konzentration von DON und den mikrobiellen Status untersucht. Es zeigte sich, dass für eine nahezu vollständige Reduktion der DON-Konzentration 5 g SBS/kg Triticale und eine Konservierungsdauer von acht Wochen erforderlich sind. PA-Supplementation allein führte nicht zur DON-Reduktion. Gleichzeitig waren aber die PA-supplementierten Varianten weniger frequent mit Schimmelpilzen und Hefen kontaminiert, so dass aus futtermittelhygienischer Sicht der Zusatz von PA zu feucht konserviertem Getreide angezeigt ist, wenn gleichzeitig eine DON-Reduktion durch SBS-Zusatz angestrebt wird.

DÄNICKE et al. (2009). Effects of increasing concentrations of sodium metabisulphite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, SBS) on deoxynivalenol (DON) concentration and microbial spoilage of triticale kernels preserved without and with propionic acid at various moisture contents. *Mycotox Res* 25:215-223.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE; Physiologisches Institut, Tierärztliche Hochschule Hannover; Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Braunschweig (alle Deutschland).

Carry over von Mutterkornalkaloiden

Die Abschätzung von negativen Effekten von Mutterkornalkaloiden auf die Gesundheit von Milchkühen ist nur ein Aspekt, der die Futtermittelsicherheit betrifft. Daneben gilt ein Futtermittel nur dann als sicher, wenn von ihm kein nachteiliger Effekt auf Lebensmittel tierischen Ursprungs ausgeht. Daher wurde der Einfluss einer steigenden Mutterkornalkaloidexposition von Milchkühen im praktisch relevanten Bereich (4,1 - 16,3 Mikrogramm/kg Körpergewicht) auf den Metabolismus und den Transfer dieser Alkaloide in die Milch untersucht. Etwa 67 % der oralen Mutterkornalkaloidzufuhr fand sich am proximalen Duodenum wieder, während die Konzentrationen aller analysierten Einzelalkaloide in der Milch kleiner als die Nachweisgrenzen der angewandten HPLC-Methode waren. Daher ist unter praktischen Fütterungsbedingungen nicht von einem für den Verbraucher relevanten Transfer von Mutterkornalkaloiden in die Milch auszugehen.

SCHUMANN et al. (2009). Effects of the level of feed intake and ergot contaminated concentrate on ergot alkaloid metabolism and carry over into milk. *Mol Nutr Food Res* 53:931-938.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE

9 ZÜCHTUNG UND GENETISCHE RES-SOURCEN

9.1 MONITORING, CHARAKTERISIERUNG UND ERHALTUNG TIERGENETISCHER RESSOURCEN

Sowohl molekulargenetische als auch quantitativ-genetische Methoden kommen beim Monitoring, der Charakterisierung und Erhaltung tiergenetischer Ressourcen zum Einsatz.

Zur Klassifizierung tiergenetischer Ressourcen bei landwirtschaftlichen Nutztieren stehen vor allen Dingen molekulargenetische Techniken im Mittelpunkt. Neben der Prüfung unterschiedlicher Markerarten (Mikrosatelliten, SNPs) und Informationsquellen (genomische DNA, mitochondriale DNA) werden neue Ansätze zur Schätzung genetischer Ähnlichkeiten zwischen Rassen und Populationen genutzt. Das Management genetischer Ressourcen bedarf sowohl des Monitorings von Populationen als auch der züchterischen Bearbeitung aufgrund von Einzeltierinformationen. Diesem Ziele dienen methodische Arbeiten zur Informationserfassung, -speicherung und -verarbeitung sowie der statistischen Analyse. Wo möglich werden generalisierte Verfahren entwickelt und in allgemein nutzbare Software implementiert.

Genetische Diversität innerhalb einer Nutztierart spiegelt sich in einer Vielzahl genetischer Varianten (Unterschiede zwischen Individuen, Familien, Rassen), die während der Domestikation angehäuft wurden, wider. Zur Erarbeitung von Maßnahmen zur Erhaltung und Nutzung tiergenetischer Ressourcen bedarf es objektiver Informationen zur Beschreibung und Bewertung der existierenden Populationen, von denen eine Vielzahl in ihrer Existenz gefährdet ist. Unterschiedliche DNA Markersysteme wurden bei Nutztieren in der Vergangenheit zur Quantifizierung genetischer Diversität zwischen und innerhalb von Rassen und Populationen herangezogen. Insbesondere beim Haushuhn, wo in kleinen Beständen außerhalb der Wirtschaftszucht oftmals verlässliche Informationen über Herkunft, Management und Größe der aktuellen Populationen fehlen, erlangen molekulargenetische Informationen eine wesentliche Bedeutung.

Untersuchungen zur Populationsstruktur beim Haushuhn

Die Verwendung molekulargenetischer Informationen zur Bewertung und Klassifizierung tiergenetischer Ressourcen bildet seit vielen Jahren einen Schwerpunkt unserer Forschungsarbeiten. In den vergangenen Jahren wurden DNA-Marker unterschiedlicher Art (Mikrosatelliten; Einzelpunktpolymorphismen [SNP], mitochondriale und autosomale Genomregionen) sowie verschiedene statistische Methoden zur Clusterung von Individuen und Populationen in verschiedenen Arbeiten verwendet. Traditionelle phylogenetische Methoden beruhen häufig auf Schätzwerten der genetischen Distanz zwischen Gruppen von Individuen (z. B. Rassen), wobei die Gruppenzugehörigkeit *a priori* definiert wird. In letzter Zeit wurden bei verschiedenen Organismengruppen Bayes'sche Verfahren der Clusteranalyse eingesetzt. Darauf basierende Algorithmen sind im Softwarepaket 'STRUCTURE' implementiert, das wir in verschiedenen Fallstudien genutzt haben (siehe Schwerpunktthema). Die voneinander abgrenzbaren Populationen Europas, Asiens und Afrikas zeigen voneinander

abweichende Charakteristika. Während europäische Rassen eher als kleine, weniger polymorphe und stärker isolierte Populationen erscheinen, sind die Populationen Asiens und insbesondere Afrikas in ihrer Diversität stark überlappend. Die identifizierten Populationsstrukturen werden bei zukünftigen Untersuchungen funktioneller Aspekte der genetischen Diversität Berücksichtigung finden.

BODZSAR *et al.* (2009). Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. *Anim Genet* 40:516-523.

GRANEVITZE *et al.* (2009). Genetic structure of a wide-spectrum chicken gene pool. *Anim Genet* 40:686-693.

Research Institute for Animal Breeding and Nutrition, Gödöllő, Hungary; The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences & Genetics, The Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agriculture, Food and Environmental Quality Sciences, Rehovot, Israel; Department of Biological Sciences, Stanford University, CA, USA; Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Einfluss des FMO3-Genotyps und der Linienherkunft auf den Trimethylamingehalt im Eidotter von Legehennen

Seit langer Zeit ist das Problem des Auftretens von Fischgeruch im Eidotter bekannt. Trimethylamin (TMA) wurde als verursachende Substanz für diese Geruchsabweichung identifiziert. In einem früheren Kooperationsprojekt mit einer finnischen Gruppe haben wir eine nichtsynonyme, d. h. die Aminosäuresequenz beeinflussende, Mutation im FMO3 (Flavinhaltige Monooxygenase 3)-Gen des Huhnes identifiziert, die mit einem erhöhten Gehalt von TMA im Eidotter assoziiert ist. Im aktuellen Projekt wurde der Einfluss unterschiedlicher TMA-Vorläufersubstanzen im Futter auf den TMA-Gehalt in Abhängigkeit vom FMO3-Genotyp bei unterschiedlichen Populationen untersucht. Während Tiere mit heterozygotem FMO3-Genotyp bei Fütterung einer erhöhten Menge Cholin (4000 mg/kg Futter) leicht angestiegene TMA-Gehalte im Eidotter gegenüber homozygoten Nichtmerkmalsträgern aufwiesen, hatte der Linienhintergrund keinen Einfluss. Die Fütterung von Raps führte bis zu einem geprüften Anteil von 30 % in der Ration nicht zum Auftreten von Fischgeruch im Hühnerei.

KRETZSCHMAR *et al.* (2009). Interactions of flavin containing monooxygenase 3 (FMO3) genotype and feeding of choline and rapeseed cake on the trimethylamine (TMA) content in egg yolks of laying hens. *Arch Anim Nutr* 63:173-187.

Friedrich-Loeffler-Institut, ITE und ING; Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven (alle Deutschland)

Zum routinemäßigen Monitoring landwirtschaftlicher Nutztierpopulationen

Die Erhaltung genetischer Vielfalt landwirtschaftlicher Nutztiere fußt zweckmäßigerweise auf der Berechnung populationsgenetischer Maßzahlen wie der Inzuchtsteigerung und der effektiven Populationsgröße. Diese und andere Parameter der Populationsdynamik lassen sich

prinzipiell aus den Abstammungsnachweisen, d. h. den Pedigrees der Zuchttiere einer Population berechnen. Ein regelmäßiges Monitoring von Zuchtpopulationen setzt ein einfach zu handhabendes und robustes Verfahren voraus. Mit der Entwicklung des Webdienstes „PopRep“, das weltweit frei unter poprep.tzv.fal.de zugänglich ist, wurde diese Voraussetzung geschaffen. Nachdem der Nutzer sein Pedigree hochgeladen hat, werden nach umfangreichen Berechnungen zwei Populationsberichte im PDF-Format per email an die Nutzer zurückgeschickt. Optional werden dem Nutzer auch tierindividuelle Inzuchtkoeffizienten sowie alle numerischen Daten der Berichtstabellen vollautomatisch zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Das Verfahren wurde zur Analyse von Milch- und Fleischrindern sowie von Schafen und Schweinen aus Brasilien, Südafrika und Deutschland eingesetzt, wobei sechs Verfahren zur Berechnung der effektiven Populationsgröße untersucht wurden.

Die Ergebnisse können sowohl für das Monitoring als auch zum Populationsmanagement genutzt werden.

GROENEVELD *et al.* (2009). POPREP: A Generic Report for Population Management. *Genet Mol Res* 8:1158-1178,

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Agricultural Research Council, Animal Production Institute, Animal Breeding and Genetics Unit, Irene, Südafrika; Departamento de Ciências Básicas, Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasilien

Ein integriertes Netzwerk von dezentralen Datenbanken für Biodiversitäts- und Genbanken (EFABISnet)

Das EFABISnet Projekt wird von der EU (ko)finanziert und von der Europäischen Vereinigung für Tierzuchtwissenschaften (EVT) koordiniert. Als weitere Partner sind Deutschland, Italien, Estland, Slowakei, Slowenien, Irland, Zypern, Niederlande, Finnland, Großbritannien, Österreich, Island, Georgien und die Schweiz beteiligt. In der ersten Phase wurde ein Netzwerk aus nationalen Datenbanken zum Monitoring genetischer Ressourcen etabliert. Im Jahr 2009 wurde dieses Netzwerk in elf Europäischen Ländern um Web-basierte Datenbanken zur Dokumentation nationaler Genbankkollektionen von kryogenem Material landwirtschaftlicher Nutztiere erweitert. Dieses ist der erste Schritt in Richtung eines vereinheitlichten Registers von Genbanken in Europa.

DUCHEV, Z.I., and E. GROENEVELD. (2009). National genebanks for cryopreservation of endangered autochthonous farm animal breeds and their documentation. In „Economics and Society development on the Base of Knowledge“ - International scientific conference June 4-5 2009, Stara Zagora, Bulgaria, pages 137-141, 04.-05. June 2009. ISBN 978-954-9329-45-2.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING

9.2 BIOTECHNOLOGIE

Die Biotechnologie eröffnet vielversprechende Perspektiven für eine kostengünstige, qualitätssichernde und -verbessernde, nachhaltige und diversifizierte Tierproduktion. Im Vordergrund der Arbeiten stehen Entwicklung neuer Verwendungs- und Nutzungsformen für landwirtschaftliche Nutztiere, Aufklärung molekularer Regelmechanismen in der Embryonalentwicklung, Klonen, die Trennung von X- und Y-Spermien, sowie bio- und molekulargenetische Analyse genetischer Diversität. Die multidisziplinären Arbeiten integrieren neueste Erkenntnisse aus dem embryologischen, reproduktions- und zellbiologischen und molekulargenetischen Methodenspektrum.

Untersuchungen zur Entwicklungsfähigkeit *in vitro* gereifter Rinderoozyten

Bovine Oozyten können einfach aus Schlachthofovarien oder über Ultraschall-geleitete Follikelpunktion von lebenden Tieren gewonnen werden. Diese Oozyten können nur nach einer *In-vitro*-Reifungsphase *in vitro* fertilisiert und bis zu transfertauglichen Embryonen kultiviert werden. Die Entwicklungsfähigkeit *in vitro* gereifter Oozyten ist trotz weltweiter Bemühungen immer noch unbefriedigend. Vor diesem Hintergrund sind zwei Studien durchgeführt worden. In der ersten Studie wurden die Verteilung mikrotubulärer Elemente im Zytoplasma, das Proteasomsystem und die Motorproteine in Oozyten aus kleinen (< 2mm) und großen (2 – 8 mm) Follikeln studiert. Unmittelbar nach Kondensation des Chromatins, d. h. dem Verschwinden des Germinalvesikels, war Dynactin eng mit dem Chromatin verbunden und interagiert mit Tubulin in Metaphase I- und II-Spindeln von Oozyten, die aus großen Follikeln isoliert worden waren. Dynactin zeigte eine perinukleäre Anhäufung. Dynein war relativ homogen im Zytoplasma von Oozyten im Germinalvesikelstadium aus beiden Gruppen verteilt und mit dem Chromatin sowohl in der Metaphase I- als auch in der Metaphase II-Spindel verbunden. Die 20S Proteasomen wurden vorzugsweise im Kern der Germinalvesikel-Stadien gefunden und waren bis zum Metaphase II-Stadium mit dem Chromatin in beiden Gruppen von Oozyten verbunden. Durch Inkubation mit einem spezifischen Phosphatase- und ATPase-Inhibitor sowie durch Anwendung eines bekannten Inhibitors der mikrotubulären Filamente (Nocodazole) konnte die Lokalisation der Proteasomen in den meiotischen Stadien verändert werden. Die Ergebnisse zeigen erstmalig den dynamischen Charakter der molekularen Motor- und Proteasomelemente während der bovinen *In-vitro*-Oozytenreifung. Durch vergleichende Untersuchungen mit *in vivo* gewonnenen gereiften Stadien kann eine Beziehung zum Entwicklungspotential ermittelt werden.

In der zweiten Studie wurden die globalen Muster von zwei Histonmodifikationen und die DNA-Methylierung während der *In-vitro*-Reifung von Oozyten aus Follikeln von zwei

Größenklassen (< als 2 mm und > 2–8 mm) untersucht. Parallel dazu wurde die relative Häufigkeit bestimmter Transkripte, die für Proteine kodieren, die am Reprogrammierungsprozess beteiligt sind, untersucht. Dies beinhaltete das HLA-B associated transcript 8 (G9A), Suppressor of variegation 3-9 homolog (SUV39H1), die somatische Isoform der DNA Methyltransferase 1 (DNMT1), die DNA Methyltransferase 3 b (DNMT3b) und Zygote Arrest 1 (ZAR1-Gen). α H3K9 wurde als bedeutende Histonmodifikation im Germinalvesikel-Stadium gefunden und blieb dort bis zum Ende der Reifungsperiode nachweisbar. Der H4K12a Antikörper gab ein starkes Signal im Germinalvesikel-Stadium, was nach dem Zusammenbruch des Germinalvesikels deutlich abfiel. Die Methylierung der DNA wurde während der gesamten Reifungsperiode gefunden. Die fünf Transkripte hatten ein genspezifisches Expressionsprofil. Diese Daten zeigen erstmalig das globale Profil in der Oozyte von H3K9me2 und H4K12ac sowie die DNA-Methylierung mit den dazugehörigen Transkriptionsprofilen von Genen, die an der epigenetischen Modifizierung boviner Oozyten während der Reifung beteiligt sind. In nachfolgenden Untersuchungen sollen die Beziehungen zum Entwicklungspotential der Oozyte untersucht werden.

RACEDO *et al.* (2009). Dynamics of microtubules, motor proteins and 20S proteasomes during bovine oocyte IVM. *Reprod Fertil Dev* 21:304–312.

RACEDO *et al.* (2009). Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in-vivo maturation. *Reprod Fertil Dev* 21:738–748.

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires; Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción, Buenos Aires; Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Department of Anatomy and Cell Biology, Indiana University School of Medicine-Evansville; Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder; Department of Natural Sciences – Technical Faculty II, Saarbrücken, (alle Deutschland)

Geschlechtsspezifische DNA-Methylierung im DMR (differentially methylated region) des IGF2 Gens

In einer vorangegangenen Studie hatten wir eine Differentially Methylated Region (DMR) innerhalb des letzten Exons des bovinen Insulin-like growth factor 2 (IGF2) Gens identifizieren können. Dies erlaubt die Möglichkeit, diagnostisch im Detail Analysen zum bovinen Imprinting und zu regulatorischen Mechanismen in der frühen embryonalen Entwicklung durchzuführen. In der neuen Studie haben wir die Bisulfidsequenzierung genutzt, um geschlechtsspezifische DNA-Profile innerhalb dieses DMR in bovinen Blastozysten zu untersuchen. Die Embryonen wurden entweder *in vivo*, durch *In-vitro*-Fertilisation und Kultur, somatischen Kerntransfer oder Androgenese und/oder Parthenogenese erstellt. Bei *in vivo* gewonnenen Embryonen wurde die DNA-Methylierung in diesem DMR nach der Fertilisierung entfernt und im Anschluss daran im ersten Teilungsstadium wieder remethyliert, mit ansteigender Menge bis hin zum

Blastozystenstadium. Bei *in vivo* gewonnenen Embryonen war der Grad der DNA-Methylierung zwischen weiblichen und männlichen Blastozysten signifikant unterschiedlich, wobei die weiblichen Blastozysten deutlich niedriger methyliert waren als die männlichen Gegenstücke. Dieser sexuelle Dimorphismus wurde auch zwischen parthenogenetischen und androgenetischen Embryonen gefunden und folgte dem Geschlecht der Spenderzellen in geklonten Blastozysten. Diese Ergebnisse zeigen die korrekte epigenetische Reprogrammierung in geklonten Embryonen und sind ein wichtiger Hinweis auf korrekte Reprogrammierung des somatischen Genoms nach somatischem Kerntransfer.

GEBERT *et al.* (2009). DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. *Genomics* 94:63–69.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Max-Planck-Institut für Molekulargenetik, Berlin-Dahlem, (beide Deutschland); Wellcome Trust/Cancer Research; UK Institute of Cancer and Development Biology and Department of Physiology, Cambridge, UK

Reprogrammierung von Kern und Nucleoli im ersten Zellzyklus bei bovinen Embryonen nach somatischem Kerntransfer

Die dem genomischen Reprogrammieren nach somatischem Kerntransfer zugrunde liegenden Mechanismen sind bis heute noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Studie haben wir die Veränderungen, die in Kern und Nucleoli während der ersten Zellzyklusphase vorgehen, im Detail analysiert. Dazu wurden geklonte Rinderembryonen aus bovinen Oozyten produziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aktivierung fixiert. *In vivo* gewonnene Embryonen dienten als Kontrolle. Geklonte und parthenogenetische Embryonen wurden prozessiert und durch Lacmoid-Färbung, Autoradiography, Transmission Electron Microscopy (TEM) und Immunfluoreszenz auf die Lokalisation von Upstream Binding Factor (UBF) und Fibrillarin vier Stunden und zwölf Stunden nach Aktivierung untersucht. Die Spenderfibroblasten zeigten starke transkriptionelle Aktivität und aktive fibrillogranuläre Nucleoli. In geklonten Embryonen wurde keine transkriptionelle Aktivität gefunden. Die somatischen Zellkerne, die in die enukleierten Oozyten übertragen worden waren, zeigten Chromatinkondensation, Kernmembranzusammenbruch, nukleoläre Desaggregation und transkriptionelle Ruhe bereits eine halbe Stunde nach der Aktivierung. Das somatische Zytoplasma war zeitweilig an den übertragenden Kern angeheftet und der Nucleolus wurde zumindest teilweise wieder aufgebaut, was den somatischen Einfluss während der frühen Klonphase anzeigt. Ein bis drei Stunden nach der Aktivierung kondensierte das Chromatin schrittweise, insbesondere an der Peripherie des Kerns, und die Kernmembran bildete sich neu. Vier Stunden nach Aktivierung zeigte der somatische Zellkern eine vorkernähnliche Struktur und bildete Nucleolar Precursor Bodies (NPB) aus, was eine zunehmende zytoplasmatische

Kontrolle der Entwicklung anzeigte. Mit diesen Daten sind erstmals wichtige Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene, die der genomischen Reprogrammierung zugrunde liegen, beschrieben worden.

ØSTRUP *et al.* 2009. Nuclear and Nucleolar Reprogramming during the First Cell Cycle in Bovine Nuclear Transfer Embryos. *Cloning and Stem Cells* 11:367-375.

Constantin the Philosopher University, Nitra, Slowakische Republik; Department of Basic Animal and Veterinary Sciences, Kopenhagen, Dänemark; Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Biotalentum LTD, Gödöllő, Ungarn

Untersuchungen zur Beziehung zwischen ovariellen Blutfluss und der Superovulationsantwort in superovulierten Milchkühen

Die Superovulationsantwort beim Rind ist trotz langjähriger und vieler internationaler Bemühungen nach wie vor durch eine hohe individuelle Variabilität gekennzeichnet. Zahlreiche Faktoren, die die Ovarantwort beeinflussen, sind inzwischen bekannt. In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob und ggf. inwieweit ovarieller Blutfluss und Superovulationsantwort nach Behandlung mit einem Gonadotropin im Zusammenhang stehen. Dazu wurde der Blutfluss mit Hilfe der transrektalen Farbdopplersonographie untersucht. Insgesamt 42 laktierende Tiere wurden sonographisch an den folgenden Tagen untersucht; Tag 10 direkt vor der hormonalen Stimulation, drei Tage nach Behandlung mit eCG und sieben Tage nach der künstlichen Besamung zusammen mit der Embryonengewinnung. Zusammen mit jeder Doppleruntersuchung wurde Blut zur Bestimmung des Gesamtöstrogen- und Progesterongehalts im peripheren Plasma gewonnen. Das Blutflussvolumen (BFV) und der Pulsatilitätsindex (PI), der Hinweise auf den Blutflusswiderstand gibt, wurden in der ovariellen Arterie gemessen. Per Ultraschall wurden Follikel und Gelbkörper gezählt. Insgesamt variierte die Anzahl der Follikel zwischen 2 und 61 und die Anzahl der Corpora lutea von 0 – 50 im Mittel ($17 \pm 1,6$). Der BFV stieg von 28,4 auf 45,0 ml pro Minute zwischen Tag 10 und 13 und erreichte ein Maximum von 108,5 ml/min an Tag 7. Der Pulsatilitätsindex fiel von 6,25 am Tag 4 auf 2,1 am Tag 7. BFV und PI am Tag 13 korrelierten nicht mit der Anzahl der Follikel. Am Tag 7 nach der Besamung korrelierte jedoch die Anzahl der Corpora lutea positiv mit dem BFV. Ein umgekehrtes Verhältnis wurde für den PI gefunden. Diese Daten zeigen, dass in Kühen die hormonale Behandlung zur Superovulationsinduktion einen deutlichen Anstieg im Blutflussvolumen zur Folge hat, verbunden mit einem markanten Abfall des Pulsatilitätsindex in der ovariellen Arterie. Es wurde jedoch keine Korrelation zwischen BFV und PI in den ovariellen Arterien vor der hormonalen Stimulation und der Anzahl der Follikel, die sich nach der Stimulierung entwickelten, festgestellt. Dies hat zur Folge, dass BFV und PI in den ovariellen Arterien nur begrenzten diagnostischen Wert haben, um das

Ergebnis einer hormonalen Superovulationsbehandlung vorherzusagen.

HONNENS *et al.* (2009). Relationships between ovarian blood flow and ovarian response to eCG-treatment of dairy cows. *Anim Reprod Sci* 113:1-10.

Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder; Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Institute for Physiology, TU München, Freising-Weihenstephan (alle Deutschland)

Zytoplasmatische Injektion zirkulärer Plasmide zur gezielten Expression von ektopischen Genen in Säugerembryonen

Die Injektion linearisierter DNA-Konstrukte in den Vorkern von frisch befruchteten Säuger-Eizellen ist seit mehr als zwei Jahrzehnten eine Standardmethode zur Produktion transgener Embryonen und Tiere. In der vorliegenden Studie haben wir kovalent geschlossene zirkuläre Plasmide in das Zytoplasma befruchteter Oozyten von Rind und Maus injiziert und haben festgestellt, dass die injizierten Gene effizient und sicher in den Embryonen exprimiert werden. Eine große Bandbreite verschiedener Plasmide konnte erfolgreich in Embryonen exprimiert werden, u. a. Plasmid Minicircles mit S/MAR-Elementen, konventionelle Plasmide und sogar bakterielle Artificial Chromosomes (BACs). Die fremden DNA-Plasmide wurden überwiegend als episomale Einheiten während der embryonalen Entwicklung im Embryo gefunden; sie verhalten sich dabei exakt wie nukleäre DNA. Der Beginn der Transkription eines Oct4 Promoter getriebenen Markergens (Oct4-GFP) war mit dem Spezies-spezifischen Beginn der embryonalen genomischen Aktivierung (Rind 8-16 Zellstadium, Maus 2-Zellstadium) kompatibel. Der Beginn der Transkription des Transgens konnte durch eine artifizielle Methylierung der injizierten DNA moduliert werden. Dieser neuentwickelte Ansatz erlaubt Studien zur Reprogrammierung in frühen Säugerembryonen. Inwieweit mit einem weiter entwickelten zytoplasmatischen Injektionsverfahren auch keimbahngängige transgene Tiere erstellt werden können, bedarf weiterer Studien.

lobal *et al.* (2009). Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques* 47:959-967.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Epigenetische Regulation, Braunschweig, (beide Deutschland)

Verteilung und Expression porciner endogener Retroviren in multi-transgenen Schweinen, die für Xenotransplantationsforschung erstellt wurden

Schweine mit mehreren immunologisch relevanten Transgenen, die für die Xenotransplantationsforschung erstellt wurden, sind im Hinblick auf die Anwesenheit und Expression porciner endogener Retroviren (PERV) untersucht worden. Ein Ziel war es, Tiere mit einer möglichst niedrigen PERV-

Population zu selektieren. Die Produktion dieser multi-transgenen Tiere kann auch zur Integration eines Transgens nah oder im Lokus eines PERV-Provirus führen, was möglicherweise mit einer gesteigerten Virusexpression verbunden sein könnte. In der vorliegenden Studie wurden nicht-transgene, einfach transgene und multi-transgene Tiere im Hinblick auf die Anwesenheit von PERV-A, -B und -C und rekombinante PERV-A/C untersucht. Dazu wurde eine sensitive PCR eingesetzt und die Expression durch *real-time* PCR ermittelt. Ein Assay, der auf der Aktivierung vom PERV in peripheren mononukleären Blutzellen durch Mitogene basiert, wurde eingesetzt, um zwischen niedrig und hoch PERV-exprimierenden Tieren zu unterscheiden. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass alle Tiere PERV-A und -B besitzen. Insgesamt 176 von 181 Tieren (97,2%) trugen PERV-C im Genom, 18 von 64 Tieren trugen PERV-A/C Rekombinanten im Genom lymphoider Zellen, aber nicht in Keimzellen. Die PERV-Expression war bei allen Tieren sehr niedrig und unterschied sich nicht zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren. Jedoch wurde zwischen Schweinen aus unterschiedlichen Zuchtlinien eine unterschiedlich hohe PERV-Expression gefunden. Die höchste Expression wurde in Minischweinen und Kreuzungsprodukten mit Minischweinen gefunden. Eine Expression viraler Proteine und eine Freisetzung von viralen Partikeln in allen transgenen Tieren wurden nicht festgestellt. Die Ergebnisse dieser Studie ergaben keine Hinweise auf PERV-Expression in multi-transgenen Tieren. Die Unterschiede in der PERV-Expression waren im Wesentlichen auf den genetischen Hintergrund der Tiere zurückzuführen. Diese Untersuchungen sind wesentlich, um geeignete Tiere für weitergehende Xenotransplantationsuntersuchungen zu selektieren.

DIECKHOFF *et al.* (2009). Distribution and expression of porcine endogenous retroviruses in multi-transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 1664-73.

Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland; Molekulare Tierzucht und Biotechnologie und Labor für funktionale Genomanalyse (LAFUGA), LMU München; Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn, Deutschland

Produktion und Charakterisierung transgener Tiere für die Xenotransplantation

Durch weltweite intensive Forschung kann heute die hyperakute Abstoßungsreaktion durch Überexpression humaner Komplementregulatoren oder durch Verwendung von Tieren mit einem homozygoten Knockout für die Galactosyltransferase sicher unterdrückt werden. Die wissenschaftlichen Anstrengungen konzentrieren sich deshalb auf die Generierung multi-transgener Tiere, in denen weitere Transgene exprimiert werden, die die nachfolgende, akut vaskuläre Abstoßungsreaktion beeinflussen können. Vor diesem Hintergrund sind von uns zwei Studien durchgeführt worden. In der ersten Studie wurden Tiere produziert, die

das humane Thrombomodulin (hTM) im Genom tragen und exprimieren. Hintergrund ist die Unfähigkeit des porzinen Thrombomodulin, das humane antikoagulative Protein C in einer Schwein-Mensch-Xenotransplantation zu aktivieren. Dies führt dann zu aberranter Koagulation und Mikrothrombosen und schließlich zum Versagen des transplantierten Organs. Mit Hilfe des somatischen Kerntransfers haben wir dreifach transgene Tiere produziert, die die humanen Komplementregulatoren hCD59 und DAF und humanes Thrombomodulin (hTM) exprimieren. Darüber hinaus wurden hTM-transgene Fibroblasten *in vivo* geprüft, um festzustellen, ob humanes Protein C aktiviert werden kann. Die transgenen Tiere wurden im Hinblick auf hTM-Integration und Expression, durch PCR/RT-PCR, Northern Blot, Western Blot, Immunstaining und FACS-Analyse im Detail charakterisiert. Insgesamt 1.040 geklonte transgene Embryonen wurden auf acht Empfängertiere übertragen, von denen fünf Tiere trächtig blieben, insgesamt 22 Ferkel wurden geboren. Die Expression von hTM wurde in allen relevanten Organsystemen, einschließlich Herz, Leber, Niere, Lunge und Bauchspeicheldrüse gefunden. Die niedrigsten Expressionsspiegel wurden in Lunge und Leber gefunden, während alle Tiere eine starke, aber häufig inkonsistente Expression von hTM in Herz, Niere und Bauchspeicheldrüse aufwiesen. Die Aktivität des hTM-Cofaktors war signifikant höher in den Fibroblasten von hTM-transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten (5-8 U/10⁵ cells/2h gegenüber 1,7 U/10⁵ cells/2h). Diese Daten zeigen erstmals, dass gesunde hTM-transgene Schweine mit Hilfe des somatischen Kerntransfers produziert werden können. hTM kann in porzinen Organen ohne Störung der Entwicklung und des porzinen Koagulationsystems exprimiert werden. Die hTM-transgenen porzinen Fibroblasten zeigten in einem neuentwickelten *In-vitro*-hTM-Aktivitätsassay eine stark erhöhte Produktion von aktiviertem Protein C. Diese Studien sind eine wesentliche Basis, um weitere Arbeiten zur Kontrolle der Koagulationsspathien nach Xenotransplantation durchzuführen.

In der zweiten Studie wurde die Wirksamkeit des anti-apoptotischen und anti-inflammatorischen Gens hA 20 (hA 20) in transgenen Schweinen untersucht. Bei hA20 handelt es sich um ein Tumor Necrosis Faktor (TNF) -induzierbares Gen, das wesentlich an der akut vaskulären Abstoßungsreaktion porziner Xenoorgane beteiligt ist. In der vorliegenden Studie haben wir transgene Schweine für hA20 produziert, im Detail charakterisiert und insbesondere untersucht, ob hA20-transgene porzine Aorta-Endothelzellen (PAECs) gegenüber Apoptoseinduktion *in vitro* resistent sind und in welchem Ausmaß hA20-transgene porzine Herzen gegenüber einer Schädigung nach Ischämie und Reperfusion geschützt waren. Durch somatischen Kerntransfer mit transgenen porzinen Fibroblasten, mit einem Konstrukt, in dem der CAGGS ubiquitäre Promoter hA20 treibt, erstellt. Die geborenen Tiere wurden dann im Detail mit Hilfe von PCR, RT-PCR, Northern and Western Blot und verschiedenen *In-*

vitro-Assays untersucht. Die hA20-transgenen Schweine entwickelten sich normal und Expression von hA20 wurde nur im Skelettmuskel, Herz und PAECs gefunden, obwohl ein ubiquitäres Promotorelement verwendet worden war. Nach Kultivierung humaner A20 transgener PAECs zeigte sich eine signifikant reduzierte Apoptose im Vergleich zu Wildtypzellen, die hA20-transgenen Zellen waren auch weniger empfänglich gegenüber der Induktion des Zelltodes durch CD59(Fas)L. Ein teilweiser Schutz der hA20-transgenen Schweineherzen wurde im Ischämie/Reperfusionmodell gefunden. Während die Infarktgröße zwischen den beiden Gruppen nach einem ischämischen Insult nicht unterschiedlich war, zeigten hA20-transgene porzine Herzen signifikant niedrigere Entzündungsaktivität (MPO) und deutlich bessere hämodynamische Eigenschaften als die entsprechenden Wildtyp-Kontrollen. Mit der vorliegenden Studie ist erstmals hA20 funktional in transgenen Schweinen exprimiert worden. Kardiomyozyten waren teilweise geschützt gegenüber Ischämieschäden. Diese Ergebnisse zeigen, dass hA20 ein viel versprechendes Molekül zur Kontrolle der akut vaskulären Abstoßungsreaktion in multi-transgenen Schweinen für die Xenotransplantation ist.

PETERSEN *et al.* (2009). Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation* 16:486-495.

OROPEZA *et al.* (2009). Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. *Xenotransplantation* 16:522-534.

Friedrich-Loeffler-Institut, ING; Transplantationslabor, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland; Hämatologie, Hämostaseologie und Onkologie; Anästhesiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland; Innere Medizin II und Abteilung für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Großhadern, München

9.3 FUNKTIONELLE GENETIK UND BIOREGULATION

Der tierische Organismus muss sich in vielfältiger Weise an unterschiedliche Umweltbedingungen anpassen. Dabei werden Reize aus der Umgebung aufgenommen, zentralnervös verarbeitet und beantwortet. Die Reaktion des Organismus spiegelt sich in Veränderungen bei einzelnen oder mehreren Funktionskreisen wider. Die einzelnen Regulationssysteme sind sehr komplex und interagieren oft sehr stark untereinander. Bei der Reizverarbeitung und -beantwortung spielen Neuropeptide und endokrin wirksame Körpersubstanzen eine wichtige, oftmals entscheidende Rolle. Als zentralnervöser Integrationsort hormoneller Regulation fungieren verschiedene Gehirnregionen, u. a. das Zwischenhirn (Hypothalamus).

Davon ausgehend werden im Forschungsbereich Funktionelle Genetik und Bioregulation folgende Themen schwerpunktmäßig bearbeitet:

- Erarbeitung systemphysiologischer Zusammenhänge der Körperfunktion landwirtschaftlicher Nutztiere
- Erforschung molekularer und physiologischer, besonders endokriner Regulationssysteme
- Verbesserung des Kenntnisstandes zur Leistungsphysiologie in der Tierproduktion
- Erforschung physiologischer Folgen von Maßnahmen in der Tierproduktion für die Biologie des tierischen Organismus.

Von diesen Arbeiten wird ein tieferes Verständnis der züchtungsbiologischen Grundlagen hormongesteuerter Systeme der Adaptation, des Wachstums und der Reproduktion bei landwirtschaftlichen Nutztieren erwartet.

Funktionelle Rolle von MikroRNAs bei der Regulation der Ovarfunktion

MikroRNAs (miRNAs) sind eine in jüngster Vergangenheit erstmals beschriebene Klasse von kleinen (19 – 25 Nukleotide) und in der Evolution konservierten, nicht-kodierenden RNA-Molekülen, die inhibierend in die Genexpression eingreifen. Damit gehören sie zu den wichtigen, z. T. ausschlaggebenden Regulatoren von biologischen Prozessen. Unser derzeitiger Wissensstand über den Einfluss der miRNAs auf die Regulation der Gonadenfunktion ist sehr limitiert und beschränkt sich auf die Beschreibung ihres Vorhandenseins in gesunden Ovarzellen bzw. beim Vorliegen von Tumoren in Ovargewebe. Das Ziel unserer Untersuchungen war, miRNAs zu identifizieren, die die Synthese und die Sekretion der wichtigen Steroidhormone aus Ovargewebe beeinflussen. Insgesamt wurden achtzig verschiedene Gen-Konstrukte und zwei spezifische Gensonden, die als antisense Konstrukte gegen korrespondierende miRNAs eingesetzt wurden, getestet. 36 der 80 getesteten Konstrukte inhibierten die Synthese und/oder die Sekretion von Progesteron in Granulosazellen, während zehn Konstrukte eine stimulierende Wirkung auf die Zellfunktion zeigten. Die Antisense-Konstrukte hoben die Wirkung der korrespondierenden miRNAs auf, was die spezifische Wirkung bestätigte. 57 miRNAs inhibierten die Synthese und/oder die Sekretion von Testosteron und nur ein miRNA-Konstrukt führte zur Stimulation der Testosteron-Produktion. Für Oestrodial ergab sich folgendes Bild: 51 miRNAs wirkten inhibierend, ein Konstrukt stimulierend. Unsere Ergebnisse stellen die erste wissenschaftliche Beschreibung für die reproduktive Funktion von MikroRNAs im Hinblick auf Steroidhormone dar.

SIROTKIN *et al.* (2009). Identification of MicroRNAs Controlling Human ovarian Cell Steroidogenesis Via a Genome-Scale Screen. *J Cell Physiol* 219:415-420.

Research Institute of Animal Production, Slovak Centre of Agricultural Studies, Nitra; Institute of Experimental Endocrinology,

Slovak Academy of Sciences, Bratislava; Polyclinics and Hospital of Nitra, (alle Slowakische Republik); Division of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy, University of Texas at Austin, Texas, USA; Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Metabolische Programmierung beim Huhn

Maternale Mangelernährung während der Trächtigkeit und/oder der Säugeperiode verursacht Langzeiteffekte auf die fötale Entwicklung und das postnatale Wachstum und hat möglicherweise auch negative Auswirkungen auf den langfristigen Gesundheitszustand der Nachkommen. Experimentell wird maternale Protein-Unterversorgung als Modell für die Untersuchung der zugrunde liegenden physiologischen Mechanismen herangezogen. Beim Säugtier konnte gezeigt werden, dass sich Proteinmangel über die Veränderung des Hormonhaushaltes der Mutter auf die Entwicklung des Fötus auswirkt. In spezifischen Geweben der Nachkommen lassen sich veränderte Profile der Genexpression nachweisen. Unsere Untersuchungen haben zum Ziel, die physiologischen Mechanismen einer Proteinunterversorgung bei Zuchthennen einer Mastlinie auf deren Fertilität und die postnatale Mastleistung der geschlüpften Küken zu erforschen. Dazu haben wir einer Gruppe von Hennen eine Futterration mit 5 % weniger Rohprotein verabreicht (10 % vs. 15 %). Während diese Futterration keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Hennen hatte, konnte eine signifikante Reduktion der Legerate und des Eigewichtes festgestellt werden. Der Leptingehalt war ebenfalls signifikant reduziert, während die Gehalte für Corticosteron, Tri-iodo-thyronine (T_3) und Thyroxin unverändert blieben. Die Küken der behandelten Legehennen hatten ein signifikant geringeres Körpergewicht nach dem Schlupf, zeigten jedoch höhere T_3 -Konzentrationen im Plasma. Ihre Wachstumsrate war höher als bei den Kontrolltieren, was nach 28 Tagen zu einem signifikant höheren Körpergewicht führte.

Einhergehend mit der höheren Wachstumsrate war auch das Expressionsmuster wichtiger metabolischer Gene signifikant aufreguliert, wie z. B. von 20-hydrosteroid-dehydrogenase, Glucocorticoid-Rezeptor, Thyrotropinreleasing Hormon und Leptin-Rezeptor. Auch die Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF-1) und des spezifischen IGF-1 Rezeptors im M. pectoralis major war signifikant erhöht. Diese Ergebnisse leisten einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der physiologischen Mechanismen der metabolischen Programmierung beim Huhn.

RAO, *et al.* (2009). Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with alteration in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. *Brit J Nutr* 102:848-857.

Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing; College of Life Science and Technology, Southwest for Nationalities, Chengdu, (beide China); Friedrich-Loeffler-Institut, ING

Zentralnervöse Regulation des Wachstums beim Huhn

Mast- und Legelinien beim Geflügel unterliegen seit vielen Jahren strengen genetischen Selektionsverfahren im Hinblick auf ihre Nutzung zur Fleisch- bzw. Eierproduktion. Als Ergebnis dieses Selektionsprozesses zeigen sie sehr deutliche phänotypische Unterschiede. Zahlreiche Studien haben entsprechende deutliche Differenzen der dafür verantwortlichen physiologischen Regelmechanismen beschrieben. Diese betreffen z. B. Wachstumsrate, Reproduktionsleistung und Metabolismus. Einhergehend damit und ursächlich dafür sind signifikante Unterschiede des endokrinen Systems beider Linien.

Der wichtigste Integrationsort des endo- und neuroendokrinen Systems befindet sich im Zentralnervensystem, insbesondere im Hypothalamus. Hier wird sowohl der Energiestoffwechsel als auch das Futteraufnahmeverhalten hauptsächlich reguliert. Verantwortlich dafür sind eine Reihe von orexi-genen (z. B. Neuropeptide Y, NPY; Orexin, ORX; agouti related protein, AGRP) und anorexigenen (z. B. pro-opio-melanocortin, POMC; corticotropin releasing hormone, CRH; glucagon-like peptid, GLP-1) Neuropeptiden.

In unseren vorliegenden Untersuchungen haben wir die Hypothese getestet, dass die Linienunterschiede ursächlich eher mit der hypothalamischen Expression von Genen der hypothalamo-hypophysären-Nebennieren 'stress'-Achse zusammenhängen als mit den orexigenen Neuropeptiden. Tiere beider Gruppen erhielten nach dem Schlupf linienspezifisches Futter ad libitum. Am Tag 7 waren signifikante Unterschiede beim Körpergewicht, der Futteraufnahme und -verwertung festzustellen. Zusätzlich zeigten die Masthähnchen eine signifikant höhere Genexpression des Glucocorticoid-Rezeptors (GCR) und -Proteins im Hypothalamus sowie reduzierte Expression des CRH. Darüber hinaus war auch das erst kürzlich bei Säugern erstmals beschriebene „fat mass and obesity associated“ (FTO)-Gen bei Broilern signifikant höher exprimiert. Damit unterstützen diese Ergebnisse unsere Hypothese und weisen darauf hin, dass im genetischen Selektionsprozess vornehmlich Gene des Energie- und Fettstoffwechsels berücksichtigt und gefördert werden und orexigene Neuropeptide eine geringere Rolle spielen.

YUAN *et al.* (2009). Layer and broiler chicks exhibit similar hypothalamic expression of orexigenic neuropeptides but distinct expression of genes related to energy homeostasis and obesity. *Brain Res* 1273:18-28.

Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing, China; Institut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe; Friedrich-Loeffler-Institut, ING, (beide Deutschland)

Evaluierung einer Immunisierungsmethode zur Unterdrückung des Ebergeruchs und deren Wirkung auf die Hormon-Sekretion beim Schwein

Chirurgische Kastration von männlichen Schweinen in der

ersten Woche nach der Geburt ist die gängige Methode, um den Ebergeruch von Schweineprodukten zu unterbinden. Die Hauptgründe für die Entstehung des Ebergeruchs sind zwei lipophile Substanzen, Androstenon und Skatol. Androstenon ist ein Steroid, dessen Produktion neonatal anfängt und bis zur Pubertät die maximalen Werte erreicht. Androstenon fungiert primär als ein Pheromon, das durch den Speichel des Ebers freigegeben wird. Skatol entsteht durch mikrobiellen Abbau der Aminosäure Tryptophan. Es wird im Dickdarm reabsorbiert und verursacht einen fäkalen Geruch des Fleisches. Skatol-Werte steigen ebenfalls nach der Pubertät beim Eber. Jedoch ist nicht ausreichend geklärt, warum kastrierte Eber weniger Skatol produzieren. Die chirurgische Kastration ist umstritten. Eine alternative Methode ist die nicht-chirurgische Kastration z. B. durch Impfung. Die Impfung mit Improvac, ein Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analog, wird seit einigen Jahren in Australien und der Schweiz verwendet. Die Impfwirkung ist in der Regel reversibel. Die Tiere müssen 2 x geimpft werden; die erste Impfung muss 8 – 10 Wochen und die zweite 4 – 6 Wochen vor der Schlachtung erfolgen. Die Impfung supprimiert die Hodenfunktion durch die Produktion von Antikörpern gegen GnRH. GnRH ist ein Neuropeptid, das vorwiegend im Hypothalamus produziert wird. Es bewirkt die Sekretion und Synthese von Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in der Hypophyse. LH und FSH regulieren die Produktion und Sekretion von Gonaden-Steroiden, u. a. Androstenon. Die Zulassung der Impfung gegen Ebergeruch in der EU steht bevor. Ziel unserer Studie war es, die Wirkung von Improvac-Impfung auf die Konzentrationen von LH, FSH und Testosteron im Blut, die Entwicklung der Hoden und die Unterdrückung des Ebergeruchs zu überprüfen. Eber Kreuzung Large White x Landrasse x Pietrain; (n = 610) wurden in drei Gruppen geteilt: Kastriert im Alter von < 1 Woche; 2 x während der Mastphase immunisiert und intakte Eber. Blutproben zur Analyse der Hormone wurden vor der zweiten Impfung sowie in definierten Abständen danach entnommen. Die Hodenhistologie sowie der Fleisch- und Fett-Geschmack, -Geruch, Skatol und Androstenon wurden nach der Schlachtung bestimmt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die LH-, FSH- und Testosteron-Konzentrationen im Blut nach der zweiten Immunisierung signifikant niedriger waren als in intakten Tieren. Fleisch und Fett von 97 % (232 von 239) der immunisierten Tiere wurden als Ebergeruch-negativ eingestuft. Dagegen das Fleisch und Fett von 94 % der intakten Tiere waren Ebergeruch-positiv.

FUCHS *et al.* (2009). Effects of a gonadotropin-releasing factor vaccine on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone concentrations and on the development of testicles and the expression of boar taint in male pigs. *Theriogenology* 72:672-680.

Field station for Epidemiology und Institute for Food Quality and Food Safety, Vet. Med. Hochschule Hannover; Friedrich-Loeffler-Institut, ING, (alle Deutschland); Clinic of Reproductive Medicine, Universität Zurich, Schweiz; Pfizer Animal Health, UK

10 ARBEITSGRUPPE INTERNATIONALE TIERGESUNDHEIT (AG-ITG)

IV

Das Jahr 2009 stand für die AG-ITG einerseits im Zeichen der internationalen Projekte zur Unterstützung der Labordiagnostik der aviären Influenza in Asien, besonders in Nepal und Laos, die im Auftrag der Welternährungsorganisation FAO durchgeführt wurden. Hinzu kamen weiterhin diverse Auslandseinsätze und Aktivitäten im Rahmen von Vorbereitungsarbeiten für die im Jahre 2008 bewilligten und 2009 begonnenen EU- und DFG-Projekte der AG-ITG im östlichen und südlichen Afrika. Außerdem wurde im Auftrag des „Crisis Management Centres“ der FAO ein Einsatz zur Diagnostik und Kontrolle der Teschen-Krankheit in Haiti durchgeführt.

Labordiagnostik zur Aviären Influenza in Asien

Mit FAO-Rom und FAO-Bangkok wurde für 2009 und die folgenden Jahre eine Serie von Langzeiteinsätzen in Ländern geplant, in denen Infektionen mit HPAIV vorkommen, deren Laborstruktur den Erfordernissen allerdings noch nicht genügend angepasst ist. Der Auftraggeber FAO legte dabei Wert auf mehrmonatige Mitarbeit in den Nationalen Referenzlaboren des jeweiligen Landes. Diese langfristigen Einsätze sollten in Form eines „training on the job“ entscheidend zur Optimierung des alltäglichen Laborablaufs einschließlich der Untersuchung von eingehenden Feldproben, der Biosicherheit, Guten Laborpraxis und Qualitätssicherung beitragen. Auf diese Weise wurde die Laborinfrastruktur verbessert und theoretisches sowie praktisches Wissen nachhaltig vermittelt. In 2009 wurden zwei Einsätze in Laos (19.01.-18.03. bzw. 01.09.-02.10.) und ein Einsatz in Nepal (02.06.-03.08.), der in 2010 durch weitere Kooperationen ergänzt werden soll, durchgeführt. In beiden Ländern kam es während des Einsatzes zu Ausbrüchen von HPAI H5N1, so dass die Diagnostik von eingehendem Probenmaterial unter Zeitdruck und unter Anwendung von erhöhten Sicherheitsmaßnahmen „geübt“ werden konnte. Die Laborinfrastruktur wurde entsprechend den Empfehlungen des FLI angepasst und verbessert, so dass BSL-2 Standards erreicht werden konnten. Über die Erfahrungen bezüglich AI-Diagnostik in den weltweit ärmsten Ländern berichtete das FLI auf dem internationalen Workshop on „Surveillance and Laboratory Diagnosis of Animal Influenza in Asia“, welcher vom 08.12.-13.12. in Geelong, Australien stattfand und stellte Vorschläge zur zukünftigen und sinnvollen Unterstützung dieser Labore zur Diskussion.

GLOBIG, A.; Friedrich-Loeffler-Institut, AG-ITG

Untersuchungen zum Wildtier-Nutztier-Mensch-Komplex in Afrika

Zurzeit werden zwei verwandte Projekte von der AG-ITG in Afrika durchgeführt: das EU-Projekt „Integrated control of neglected zoonoses: improving human health and animal production through scientific innovation and public engagement“ und das DFG-Projekt „*M. bovis* in the wildlife-livestock-human interface of East and Southern Africa“.

Im Rahmen der beiden Projekte wird versucht, alle Aspekte des Wildtier-Nutztier-Mensch-Komplexes zu bearbeiten. In Kenia, Tansania und Mosambik werden die verschiedensten Wildtiere in ihrem natürlichen Lebensraum auf bovine Tuberkulose untersucht. Rinder, die sich nahe oder manchmal auch in diesen Nationalparks aufhalten, werden in die Untersuchungen mit eingebunden. Während sich die Untersuchung der Wildtiere hauptsächlich opportunistisch gestaltet, werden bei den Rindern alle heute bekannten Untersuchungsmöglichkeiten zur Anwendung gebracht. Die Anwendung dieser Tests soll nicht nur sicherstellen, dass vorhandene Tuberkulosefälle gefunden werden, sondern auch die Zuverlässigkeit der Tests unter afrikanischen Feldbedingungen evaluieren.

Die Probennahme wurde vor Ort mit den Projektpartnern organisiert und Schulungen der Mitarbeiter durchgeführt. Regelmäßig erfolgen auch gemeinsame Probensammlungen und die Analysen der gesammelten Proben in den Projektgebieten.

TANNER, M. und MOSER, I.; Friedrich-Loeffler-Institut, AG-ITG und IBIZ

Teschchen-Krankheit in Haiti

Vom 3.06. – 14.06. unterstützte die AG-ITG eine Mission des FAO-„Crisis Management Centres“ (CMC) „Mission d'intervention rapide Encéphalomyélite Porcine à Teschovirus- Haiti“ zur Evaluierung der Situation in Haiti, nachdem eine Infektion des Schweinebestandes mit Teschener Schweinelähmung nachgewiesen wurde. Nach gründlicher Untersuchung der Sachlage wurde den haitischen Behörden empfohlen, die Zusammenarbeit mit den Kollegen in der Region, besonders mit der Dominikanischen Republik, zu verstärken, eine Neugestaltung der Krankheits-Überwachung durch den Veterinärdienst einzuleiten, Sensibilisierungskampagnen für die tierhaltende Bevölkerung zu veranstalten und Trainings für die Veterinäre und die Veterinär-Techniker durchzuführen. Zur Unterstützung dieser Maßnahmen und der Konzeption einer noch zu planenden dreijährigen Impfkampagne wurde ein FAO TCP Projekt als erster Schritt vorgeschlagen. Außerdem wurde mit Vertretern der Weltbank, USAID und der Europäischen Kommission verhandelt, um eine weitergehende Unterstützung sicherzustellen.

BÖHLE, W.; Friedrich-Loeffler-Institut, AG-ITG

11 EPIDEMIOLOGIE UND RISIKOBEWERTUNG

11.1 INFORMATIK

Tierseuchenausbreitung auf Kontaktnetzen

Es wird die Fragestellung untersucht, wie sich eine Tierkrankheit auf dem Kontaktnetzwerk landwirtschaftlicher Betriebe ausbreitet. Dazu werden Daten aus der HI-Tier Datenbank ausgewertet. Aus diesen Daten kann festgestellt werden, wer Tiere an wen verkauft hat. Aus diesen Informationen lässt sich ein Netzwerk aus Knoten und Kanten aufspannen. Die Knoten sind die handelnden Betriebe und die Kanten sind die Handelsbeziehungen zwischen den Betrieben. Aus den HI-Tier Daten wurde ein Kontakt-Netzwerk landwirtschaftlicher Betriebe mit Schweinehaltung bestehend aus ca. 120.000 Knoten und ca. 330.000 gerichteten Kanten generiert.

Das so gewonnene Netzwerk wurde zunächst hinsichtlich seiner Eigenschaften analysiert. Es zeigten sich viele Gemeinsamkeiten mit anderen bekannten Netzwerken wie z. B. sozialen Kontaktstrukturen oder Hyperlinks im world wide web. Die Anzahl an Handelspartnern, die ein Betrieb hat – also die Anzahl der Kanten, die mit einem Knoten verbunden sind – wird als Grad bezeichnet. Die Verteilung der Grade im Netz folgt einem Potenzgesetz. Das bedeutet, dass es auch für das Auftreten sehr großer Grade eine endliche Wahrscheinlichkeit gibt. Es gibt keine typische Gradverteilung. Durch diese Eigenschaft wird die Dynamik der Krankheitsausbreitung stark beeinflusst. Zum Beispiel kann sich eine Infektionskrankheit auf Kontaktnetzen, die einer Gradverteilung nach Potenzgesetzen folgen, immer ausbreiten. Ein epidemiologischer Schwellenwert R_0 existiert nicht.

Der Grad eines Knotens ist ein sogenanntes Zentralitätsmaß. Zentralitätsmaße sollen die Relevanz einzelner Knoten im Netz bestimmen. Ein anderes Zentralitätsmaß ist z. B. die Zwischenzentralität eines Knotens. Diese gibt an, wie viele kürzeste Wege über einen Knoten laufen. Für den Ausbruch einer Krankheit ist die Reichweite eines Knotens von großer Bedeutung. Die Reichweite gibt an, wie viele Knoten man von einem Startpunkt aus in einer beliebigen Anzahl an Schritten entlang der Kanten überhaupt erreichen kann. Interessanterweise gibt es im Kontaktnetz zwischen landwirtschaftlichen Betrieben mit Schweinehaltung nur zwei sehr scharf voneinander abgegrenzte Bereiche: kurz reichende Knoten und Knoten mit langer Reichweite. Letztere sind für die Verbreitung einer Krankheit besonders bedeutsam.

Für gezielte Gegenmaßnahmen im Fall eines Ausbruchs ist es hilfreich, das Handelsnetz in mehrere Kompartimente zerlegen zu können. Diese Zerlegung für ein Netzwerk zu finden ist eine komplexe Aufgabe und kann auf verschiedene Arten geschehen. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, die Kompartimente derart zu suchen, dass es viele Kanten innerhalb und nur wenige Kanten zwischen den Kompartimenten gibt. Obwohl für die Berechnung solcher Gemeinschaftsstrukturen keine geographische Information benutzt wurde, zeigt sich eine erstaunlich scharfe Trennung der Gemeinschaften, wenn sie anschließend auf der Landkarte dargestellt werden.

Der Ausbruch von Infektionskrankheiten wird durch ein SIR Modell beschrieben, das die Wechselwirkungen zwischen Gesunden (S), Infizierten (I) und Geheilten (R) beschreibt. Für die Wechselwirkung zwischen Gesunden und Infizierten wird innerhalb der Betriebe eine homogene Mischung angenommen. Der Kontakt zwischen Betrieben ergibt sich aus der durch den Handel bedingten Kontaktstruktur. Zurzeit wird ein mathematisches Modell entwickelt, das sowohl die zeitliche als auch die räumliche Dynamik der Krankheitsausbreitung erfasst. Das Modell wird entwickelt, um effiziente Verfahren der Tierseuchenbekämpfung angeben zu können.

LENTZ, H., M. KASPER und T. SELHORST (2009). Beschreibung des Handels mit Rindern in Deutschland mittels Netzwerkanalyse – Ergebnisse von Voruntersuchungen. Berl Münch Tierärztl Wschr 122:193-198.

Friedrich-Loeffler-Institut, IfE

Nationale Datenbank „Wildvogel-Monitoring zur Aviären Influenza“

Nachdem im Jahr 2006 das hochpathogene aviäre Influenzavirus vom Subtyp H5N1 'Asia' zum ersten Mal in Deutschland festgestellt wurde, stellte das FLI Ende des Jahres eine Datenbank über das Internet zur Verfügung, um dem umfangreichen bundesweiten Wildvogelmonitoring eine geeignete Plattform für die Datensammlung und -auswertung zu bieten. In der Datenbank wird jeder tot aufgefundene, erlegte oder lebend beprobte Wildvogel mit seinen spezifischen Kennzeichen (z. B. Spezies, Geschlecht, Alter, Lokalisation) sowie den spezifischen virologischen und/oder serologischen Laborergebnissen bezüglich Influenzavirus-Infektionen erfasst. Da alle negativen und positiven Befunde berücksichtigt werden, ergeben sich neue Analysemöglichkeiten (z. B. Prävalenzschätzungen und die Beurteilung der Aussagekraft der Untersuchungen in den jeweiligen geographischen Einheiten). Neben den zentral bereitgestellten Auswertungsmöglichkeiten in Form von Tabellen, Diagrammen und Karten wurde eine vollständige Kompatibilität zur europäischen Wildvogel-Datenbank bei der Europäischen Kommission implementiert, um eine lückenlose Datenübertragung zu gewährleisten. Die Berichterstattung an die Europäische Kommission wurde

im Jahr 2009 um ein Modul zur Kofinanzierung ergänzt, welches die automatische Erzeugung und Übermittlung spezifischer finanzieller Berichte an das BMELV ermöglicht.

New Flubird Datenbank – ein Werkzeug zum Datenaustausch und Erkenntnisgewinn im Rahmen der Surveillance von aviären Influenzaviren bei Wildvögeln

Mit dem Ziel, den fortbestehenden Erkenntnislücken bezüglich der Biologie und Verbreitung von aviären Influenzaviren bei Wildvögeln zu begegnen, wurde 2006 im Rahmen eines EU FP6 Projektes („NewFluBird“ - Network for Early Warning of Influenza Viruses in Migratory Birds in Europe) ein interdisziplinäres Netzwerk geschaffen, in das Experten aus den Bereichen Virologie, Ornithologie und Epidemiologie eingebunden sind. Der Austausch von Daten und Expertenwissen sowie der gemeinsame Aufbau einer zielgerichteten Surveillance sollen erleichtert und instrumentalisiert werden. Als zentrales Werkzeug wurde vom FLI eine Datenbank entworfen, in der AIV- bzw. ornithologiebezogene Daten und Erkenntnisse der genannten Fachrichtungen zusammengeführt werden können. Eine angeschlossene Web-Applikation bietet den dreizehn Partnerinstituten unterschiedliche Möglichkeiten zur interaktiven Aufbereitung, Integration und Analyse der Datensammlung.

Gemeinsame Datenbank über die epidemiologische Situation der Schweinepest bei Wildschweinen in Frankreich, Belgien, den Niederlanden, Luxemburg und Deutschland

Im September 2002 wurde am Institut für Epidemiologie in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe zur Schweinepest bei Wildschweinen der Europäischen Kommission die Entwicklung eines Einzeltier-basierten Datenbanksystems zur epidemiologischen Situation der Schweinepest bei Wildschweinen in Frankreich, Belgien, den Niederlanden, Luxemburg und Deutschland (Bundesländer Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz und Saarland) begonnen. Die Datenbank wurde als Internet-Projekt realisiert und erlaubt die Dateneingabe sowie die Auswertung der Untersuchungsdaten alleine über einen Internet-Browser. Der Zugang der Internet-Seite ist durch Sicherheitsmechanismen geschützt. Die Dateneingabe umfasst die Charakterisierung des einzelnen Wildschweins (Geschlecht, Alter, Todesursache und Lokalisation) sowie die Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchung (Virologie und/oder Serologie) und kann sowohl über eine HTML-Maske im Browser als auch durch Upload über eine Batch-Datei für größere Datenmengen erfolgen. Zu diesem Zwecke wurden entsprechende Schnittstellen zu Datenbanksystemen der Untersuchungseinrichtungen geschaffen. Neben der tabellarischen Auswertung stratifiziert nach Zeitraum, administrativen Einheiten

(z. B. Mitgliedsstaat, Bundesland, Kreis), Altersklassen, Resultaten erlaubt ein Internet-Kartenserver auch die Darstellung der Untersuchungsergebnisse in Form von Karten unter Berücksichtigung der administrativen Grenzen und topographischen Gegebenheiten. Die Feststellung der Schweinepest bei Wildschweinen zu Beginn des Jahres 2009 in Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz führte zu einer Erweiterung der Datenbank um die Bundesländer Baden-Württemberg, Hessen und Niedersachsen.

11.2 BIOSTATISTIK

Die Biostatistik am Institut für Epidemiologie ist im Wesentlichen mit der Absicherung von Aussagen hinsichtlich der Entwicklung des Gesundheitszustandes von Tierpopulationen befasst. Da dieses stets zeitlich und räumlich bezogene Aussagen sind, gilt insbesondere das Interesse den (möglichen) zeitlichen Zustandsänderungen mit räumlichem Bezug. Risikoanalysen stellen in diesem Zusammenhang eine sehr spezielle Anwendung dar. Eine allgemeine Beschreibung der Dynamik liefern theoretische Modelle. In Vorbereitung auf dieses Ziel werden zunächst zeitstatische Zustände vorwiegend mit Hilfe von Geographischen Informationssystemen dargestellt. Basis aller Aussagen bilden Messungen zu relevanten (Modell-)Parametern, die häufig aus Mengen von labordiagnostischen Ergebnissen abgeleitet werden. Da diese Ergebnisse, verursacht durch imperfekte Diagnostik, nicht immer den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen, sind Werkzeuge erforderlich, die notwendige Korrekturen von Messungen ausführen und zu einer gewissen Sicherheit eine Aussage über ihre Präzision treffen. Hierfür müssen Computerprogramme den praktischen Anforderungen folgend sowohl zur Bestimmung von Stichprobenumfängen als auch zur Berechnung von Konfidenzintervallen als Basiswerkzeuge weiterentwickelt werden. In der Vergangenheit war die Umkehrung, die eine Anpassung der Bewertung von labordiagnostischen Ergebnissen an gestellte Erfordernisse mit unterschiedlichsten Zielkriterien beinhaltet, unberücksichtigt geblieben. Im Jahre 2009 wurde ein Prototyp für die auf Dichtemessungen beruhende Diagnostik fertig gestellt.

Dokumentation

Das Institut für Epidemiologie des FLI pflegt eine Reihe von Datenbanken und Meldesystemen, die der Erfassung von Daten dienen, die im Rahmen der Überwachungstätigkeit der Länder im Bereich Tiergesundheit erhoben werden (u. a. Tierseuchennachrichtensystem [TSN], KSP-Wildschweinedatenbank, AI-Wildvogelmonitoringdatenbank). Die in diesen Datenbanken gespeicherten Informationen dienen dem BMELV als Grundlage für die Berichterstattung an die

Europäische Kommission und an die Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE).

Im Jahr 2009 lag ein besonderer Aufgabenschwerpunkt darin, die im TSN hinterlegten Kataloge, d. h. kodierten Begriffslisten z. B. aller Tierarten, Diagnoseverfahren etc. grundlegend zu überarbeiten und hierarchisch zu sortieren bzw. zu facettieren. Dabei wird auch eine Harmonisierung mit den vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) geplanten Kodierkatalogen angestrebt, die künftig für den Datenaustausch in den Bereichen Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit Verwendung finden sollen.

12 ZELLBANK

Bestand

Im Berichtszeitraum wurden 63 neue Zelllinien in die Zellbank aufgenommen. Dabei handelt es sich um:

- ▶ 18 etablierte Linien aus anderen wissenschaftlichen Einrichtungen des In- und Auslandes
- ▶ 16 Eigenanzüchtungen (Amsel, Amerikanische Klippenschwalbe, Fledermaus, Zwergflusspferd, Nördliches Breitmaulnashorn), deren Linienentwicklung noch nicht abgeschlossen ist.
- ▶ 15 Hybridome aus Arbeitsgruppen des FLI
- ▶ 14 gentechnisch veränderte Linien verschiedener Arbeitsgruppen des FLI

Die Zellkultursammlung verfügt über 1.200 Zelllinien von 74 Tierarten und dem Menschen.

Zur Gewährleistung der Identität werden verschiedene Methoden verwendet: Isoenzymanalyse, Sequenzierung, STR-Genotypisierung.

Lenk, M.; Friedrich-Loeffler-Institut, IMED

MALDI-Typisierung von Zellkulturen

Geeignete Zell- oder Gewebekulturen sind eine der Grundvoraussetzungen für die virologische Forschung. Ein regelmäßiges Problem bei der Haltung von Zellkulturen ist die Gefahr der Verwechslung, Vermischung oder Fehlbezeichnung und damit eine zweifelhafte Authentizität der im Experiment verwendeten Zellchargen. Die Zellbank des FLI hält eine Vielzahl von Zell- und Gewebekulturen vor, deren Authentizität durch zytologische und genetische Verfahren nachgewiesen ist. Dennoch war ein Verfahren wünschenswert, das eine schnelle, preiswerte und dennoch aussagefähige Bestätigung der Identität einer bestimmten Zellcharge erlauben würde. Das aufgrund seiner hohen Kosteneffizienz, Schnelligkeit und Aussagekraft zur Identifizierung

fizierung und Charakterisierung von Bakterien schon weitläufig benutzte Verfahren der ‚MALDI-Typisierung‘ wurde erstmals an 66 Zellkulturen aus 34 verschiedenen Spezies erprobt. Die Kulturen wurden in einem einfachen Verfahren extrahiert und die aus den Extrakten erhaltenen Massenspektren in einer Referenzspektrenbank hinterlegt. Die sichere Bestimmung aller Zellkulturproben durch MALDI-Typisierung erwies sich als möglich. Ebenso gelang die Identifizierung der Spezies unbekannter Zellkulturproben anhand des Vergleiches mit den Referenzspektren, wenn in der Spektrensammlung Spektren aus Zellkulturen der gleichen Spezies hinterlegt waren.

KARGER *et al.* (2009). Rapid characterisation of cell cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric typing. *J Virol Methods* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.11.022>]

Friedrich-Loeffler-Institut, IMB und IMED

BETEILIGUNGEN DES FLI AN NATIONALEN UND INTERNATIONALEN FORSCHUNGSVERBÜNDEN UND EXZELLENZNETZWERKEN:

Durch seine Forschungsarbeiten ist das FLI auch ein gefragter Partner in großen Forschungsverbänden und -konsortien. Im Folgenden werden wichtige nationale und internationale Beteiligungen an Forschungsverbänden und Exzellenznetzwerken dargestellt.

A) EUROPÄISCHE UND INTERNATIONALE FORSCHUNGSVERBÜNDE

Forschungsverbund / Netzwerk	Beteiligte Institute am FLI
EPIZONE FP6 Network of Excellence, 19 Partner, 2006-2011 Epizootic Disease Diagnosis and Control	IVD, IMED, IMB, IfE, IfI, INNT
NADIR FP7 Forschungsinfrastruktur-Ausschreibung, 14 Partner, 2009-2013 The Network of Animal Disease Infectiology Research Facilities	INNT
NeuroPrion FP6 Network of Excellence, 54 Partner, 2003-2009 Prevention, control and management of prion diseases	INNT, IfI
VENoMYC FP6 Network of Excellence, 37 Partner, 2004-2009 Veterinary Network of Laboratories Researching into improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases	IMP
Xenome FP6 Integrated Project, 21 Partner, 2006-2011 Engineering of the porcine genome for xenotransplantation studies in primates: a step towards clinical application	ING
EMPERIE FP7 Large-scale integrating project, 12 Partner, 2009-2014 European Management Platform for Emerging and Reemerging Infectious Disease Entities	IVD
IMAQUANIM FP6 Integrated Project, 20 Partner, 2005-2010 Improved immunity of aquacultured animals	IMED
WILDTECH FP7 Large Collaborative Project, 14 Partner, 2009-2013 Novel Technologies for Surveillance of Emerging and Re-emerging Infections of Wildlife	IMP
Rednex FP7 Large-scale integrating project, 11 Partner, 2008-2013 Innovative and practical management approaches to reduce nitrogen excretion by ruminants	ITE
ASFRISK FP7 Small or medium-scale focused research project, 17 Partner, 2008-2011 Evaluating and controlling the risk of African Swine fever in the EU	IMB
CSFV-GODIVA FP7 Small or medium-scale focused research project, 17 Partner, 2009-2013 Improve tools and strategies for the prevention and control of classical swine fever	IVD
ICONZ FP7 Collaborative project im SICA Programm der EU, 2009 -2014 Integrated control of neglected zoonoses: improving human health and animal production through scientific innovation and public engagement	IMP, AG-ITG
EQADeBa Förderprogramm der Exekutivagentur für Gesundheit und Verbraucher, 23 Partner, 2008-2011 Establishment of Quality Assurance for Detection of Highly Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism	IBIZ
Network DAFINET Danish Council for Strategic Research, 15 Partner, 2009-2013 Danish Fish Immunology Research Network	IMED

B) NATIONALE FORSCHUNGSVERBÜNDE

Forschungsverbund / Netzwerk	Beteiligte Institute
Exzellenzcluster REBIRTH DFG-Exzellenzcluster der Medizinischen Hochschule Hannover seit 2006 From Regenerative Biology to Reconstructive Therapy	ING
Nationale Forschungsplattform für Zoonosen BMBF gefördertes, interdisziplinäres Informations- und Servicenetz für die Zoonose-Forschung, 2009 – 2011	INNT
BMBF-Forschungsverbände Zoonosen (2007-2010): Q-Fieber - Erforschung der molekularen Pathogenese des Q-Fiebers und ihre Anwendung und Diagnostik und Epidemiologie in Deutschland Zoonotische Chlamydien - Modelle für chronische und persistente Infektionen bei Mensch und Tier ZooMap- <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> - von der John'schen Krankheit zum Morbus Crohn Die Zoonose Botulismus Toxoplasmose - Netzwerk zur Toxoplasmose bei Mensch und Tier in Deutschland: Pathogenese, Risikofaktoren und Kontrolle Arbovirusinfektionen in Deutschland Influenza - FluResearchNet	IBIZ IMP IMP IBIZ IfE INNT IfI
IPSILAM BMBF Forschungsverbund; 2009 - Induzierte pluripotente Stammzellen in Großtiermodellen (IPSILAM)	ING
BMBF Forschungsverbund Forschung für die zivile Sicherheit: ATLAS Autonomes-Tierseuchen-Lab-on-a-Chip-System	IBIZ
BMBF Forschungsverbund Forschung für die zivile Sicherheit: PathoSafe Raman-Spektroskopie zur Detektion agroterroristisch relevanter Erreger der Sicherheitsstufe 3	IBIZ
BMBF Forschungsverbund PET/CT zur Darstellung von Infektion und Entzündung: Reduction, Refinement und Replacement von Tierversuchen	IMP
DFG-Forschergruppe RU 1041 Germ Cell Potential	ING
DFG-Forschergruppe RU 535 Xenotransplantation	ING
DFG-Forschergruppe RU 478 Mechanisms of embryo-maternal communications	ING
Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“	INNT

V. BEHÖRDLICHE AUFGABEN

1 AUFGABEN IM RAHMEN DES GENTECHNIKRECHTS

Das Friedrich-Loeffler-Institut ist Einvernehmensbehörde bei Verfahren zur Freisetzung bzw. zum Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Tieren sowie von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, die an Tieren angewendet werden sollen. Im Zusammenhang mit dieser Aufgabe ist das FLI auch beratend tätig bei der Fortschreibung des Gentechnikrechtes sowie allgemeinen Fragen der biologischen Sicherheit, soweit Tierseuchenerreger betroffen sind.

2 NATIONALE REFERENZ-LABORATORIEN

Als zuständige Bundeseinrichtung betreibt das Friedrich-Loeffler-Institut über 50 nationale Referenzlaboratorien (NRL) für anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten. Hiervon sind acht von der Weltorganisation für Tiergesundheit, dem Office International des Épizooties (OIE), als OIE-Referenzlabore bestellt. Die NRLs nehmen die mit der Benennung verbundenen Aufgaben wahr und unterstützen die entsprechenden Untersuchungseinrichtungen in den Ländern. Die rechtlichen Grundlagen sind im Kapitel V.3 aufgeführt.

Insbesondere sind die NRLs für die Bestätigung von Diagnosen und Abklärung von Verdachtsfällen verantwortlich. Hierzu zählen die Entwicklung und Validierung neuer sowie die kontinuierliche Optimierung der bestehenden diagnostischen Verfahren und der dazu benötigten Reagenzien. Standardisierte Verfahren werden an die entsprechenden Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer transferiert, die zudem spezifische Referenzmaterialien wie Seren und Virusstämme erhalten. Im Rahmen der Qualitätssicherung der Tierseuchendiagnostik führen die NRLs Ringversuche für deutsche Untersuchungseinrichtungen durch und nehmen selbst an internationalen Ringversuchen teil.

Zu den hoheitlichen Aufgaben gehören außerdem Zulassungs- und Chargenprüfungen von Diagnostika, die Beratung der Veterinärbehörden sowie die Erarbeitung von Grundlagen für Leitungsentscheidungen, Stellungnahmen zu Entwürfen sowie Änderungen oder Neufassungen von Richtlinien. Weiterhin führen die NRLs Import/Export-Diagnostik durch.

Die Nationalen Referenzlaboratorien am FLI wurden von der Akkreditierungsstelle (AKS) Hannover nach ISO/IEC 17025:2005 akkreditiert.

Nachfolgend geben die NRLs einen Überblick ihrer Arbeiten für das Jahr 2009.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR AFRIKANISCHE SCHWEINEPEST

Blome, S., Haas, B.

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) wird durch ein DNA-Virus des Genus *Asfivirus* verursacht und lässt sich klinisch nicht von der klassischen Schweinepest unterscheiden. Das Virus infiziert alle Vertreter der Familie *Suidae*, zu der unter anderem das Hausschwein, das europäische Wildschwein sowie Warzen- und Buschschweine gehören. Zusätzlich kann sich das Virus in Zecken des Genus *Ornithodoros* vermehren. Das Hauptverbreitungsgebiet der ASP liegt in den afrikanischen Staaten südlich der Sahara, es sind jedoch in letzter Zeit ASP-Ausbrüche z. B. in Georgien, Armenien und Russland aufgetreten. Die ASP gehört zu den Erkrankungen, die sowohl national als auch international anzeigepflichtig sind. Die Aufgaben des Referenzlabors für Afrikanische Schweinepest (ASP) sind im Anhang IV der EU Richtlinie 2002/60 festgelegt und ergeben sich darüber hinaus aus dem Tierseuchengesetz.

Im Jahr 2009 sind in Deutschland keine Fälle von ASP registriert worden.

	Anzahl
Erregernachweise Hausschweineproben	1
Ringtests (Teilnahme am EU Ringtest 2009)	1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR ANSTECKENDE SCHWEINE-LÄHMUNG (TESCHENER KRANKHEIT)

Dauber, M.

Bei der ansteckenden Schweinelähmung handelt es sich um eine Erkrankung der Haus- und Wildschweine, die durch bestimmte Virusstämme aus der Familie *Picornaviridae*, Genus *Teschovirus*, verursacht werden kann. Ihre Abgrenzung von mildereren, nicht anzeigepflichtigen Verlaufsformen ist im Einzelfall problematisch. Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles sind: a) epidemiologisch auffällige, gehäuft auftretende schwere klinische Erkrankungen, b) die histologische Untersuchung bestätigt das Vorliegen einer nicht eitrigen Polioenzephalomyelitis, c) differentialdiagnostisch sind andere Krankheiten, insbesondere Tollwut und Schweinepest, ausgeschlossen und d) *Teschovirus* (in der Regel vom Serotyp 1) wurde identifiziert. Auf Grund der notwendigen komplexen Betrachtungsweise

kann das Referenzlabor für Ansteckende Schweinelähmung lediglich Virusnachweise verifizieren, nicht jedoch eine abschließende Diagnose der Krankheit stellen.

	Anzahl
Einsendungen Referenzproben	52
Erregernachweise gesamt	46
RT-PCR	17
Anzüchtung, IFT	40
Erregertypisierung	11
Abgabe von Referenzmaterialien (MAK)	1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR AUJESZKYSCHES KRANKHEIT

Müller, T.

Die Aujeszky'sche Krankheit (AK) kommt weltweit vor und wird durch das Suid Herpesvirus 1, auch als Pseudorabiesvirus (PrV) oder Virus der Aujeszky'schen Krankheit (AKV) bezeichnet, verursacht. Die AK ist eine gefährliche virale Schweineerkrankung und verursacht erhebliche ökonomische Schäden und Verluste in der Schweineproduktion. Infolge der Implementierung eines strikten nationalen Bekämpfungsprogrammes konnte die AK in der Hausschweinepopulation Deutschlands getilgt werden. Seit 2003 gilt Deutschland offiziell als frei von AK. Die Aufrechterhaltung des AK-freien Status ist an jährliche serologische Untersuchungen gemäß einem zweistufigen Stichprobenplan gekoppelt. Die Aufgaben des NRL für Aujeszky'sche Krankheit (AK) umfassen drei wesentliche Schwerpunkte: die Labordiagnostik (Abklärung von AK-Verdachtsfällen), die Standardisierung der Diagnostik sowie hoheitliche Aufgaben (Erarbeitung von Grundlagen für Leitungsentscheidungen, Stellungnahmen zu Entwürfen, Änderungen oder Neufassungen von nationalen, EU- bzw. OIE-Richtlinien).

	Spezifizierung	Anzahl
Anzahl Einsendungen Referenzproben		18
Anzahl Erregernachweise		1
Anzahl Antikörpernachweise	ELISA, SNT (OIE-Empfehlung)	12
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen		keine
Abgabe von Referenzmaterialien		1
Ringtests		keiner

OIE UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR AVIÄRE INFLUENZA

Harder, T.

Die hochpathogene aviäre Influenza (HPAI) ist eine mit sehr hohen wirtschaftlichen Verlusten einhergehende, ansteckende Infektionskrankheit des Geflügels. Derzeit wird das Infektionsgeschehen durch eine Panzootie mit dem zoonanthropotischen HPAI Virus des Subtyps H5N1 bestimmt. Endemische Infektionsherde wurden in Südostasien und Ägypten ausgewiesen. Europa war 2009 lediglich von einem einzelnen Nachweis in einer erlegten Stockente aus Bayern betroffen. Andere hochpathogene AIV (H7) traten in Europa in Spanien auf. Weiterhin wurden Ausbrüche niedrigpathogener aviärer Influenzaviren der Subtypen H5 sowie H7 in deutschen Geflügelhaltungen registriert und getilgt, wobei ein größeres Ausbruchskluster in industriellen Putenhaltungen in Niedersachsen registriert wurde. Die fortgesetzten Untersuchungen im Rahmen dieses Geschehens sowie das EU-kofinanzierte Monitoring von Wildvögeln führten auch 2009 wieder zu einem beachtenswerten Probeneingang. Darüber hinaus wurden 2009 auch stark vermehrt Proben von Schweinen zur virologischen Untersuchung auf Influenzaviren bearbeitet. Dieses Probenaufkommen steht in Verbindung mit der humanen Influenzapandemie durch das neue H1N1 Virus (sogenannte Schweinegrippe).

	Spezifizierung	Anzahl
Einsendungen Referenzproben	Virologisch,	3.120
	davon porcine Proben	738
	Serologisch	1.784
Erregernachweise	Influenzavirus (molekular)	175
	davon porcine Proben	9
	Subtypebene (molekular)	105
	Isolate	29
Antikörpernachweise (ELISA)		815
Zulassungsuntersuchungen / Chargenprüfungen		2/11
Abgabe von Referenzmaterialien	National	118
	International	311
Ringtests	Teilnahme	3
	Eigene Organisation	1
Ausbildung (Wissenschaftler)	National	2 (15 Wochen)
	International	9 (24 Wochen)

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BESCHÄLSEUCHE

Moser, I.

Die Beschälseuche ist eine durch den einzelligen Parasiten *Trypanosoma (T.) equiperdum* hervorgerufene, meist chronisch verlaufende klassische Deckinfektion bei Equiden. Sie zählt zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen und ist seit vielen Jahren in Deutschland getilgt. Zur Aufrechterhaltung des Status der Seuchenfreiheit werden sowohl Tiere, die importiert werden, als auch Tiere, die im Inland gezogen sind und Verwendung in der Zucht finden sollen, mittels Komplement-Bindungsreaktion (KBR; vom OIE empfohlene Methode) auf spezifische Serum-Antikörper untersucht, da ein direkter Erregernachweis außer im akuten Stadium der Erkrankung kaum möglich ist. Die enge Verwandtschaft des Erregers mit *T. evansi*, dem Erreger der Surra bei Kameliden und Equiden, kann jedoch zu Kreuzreaktivitäten bei serologischen Reaktionen führen. *T. evansi* kann beim Pferd ähnliche Symptome wie *T. equiperdum* auslösen, zählt jedoch nicht zu den Erregern einer anzeigepflichtigen Tierseuche. *T. evansi* kommt in tropischen Regionen (Nordafrika, Mittlerer Osten, Asien, Lateinamerika) vor und wird von Tabaniden übertragen. Neuere molekulare Untersuchungen deuten darauf hin, dass *T. equiperdum* keine eigene Spezies ist, sondern zum Taxon *T. evansi* gehört. Aufgrund der engen Verwandtschaft der Erreger und der Ähnlichkeit der hervorgerufenen Symptome wäre es sinnvoll, die Unterteilung der Erreger in einen „anzeigepflichtigen“ (*T. equiperdum*) und einen „nicht anzeigepflichtigen“ (*T. evansi*) zu beenden und zu definieren, dass Beschälseuche durch Trypanosomen der Spezies *T. equiperdum* / *T. evansi* verursacht und damit der Nachweis beider Erreger reglementiert wird.

	Anzahl
Einsendungen	4
Antikörpernachweise: Komplement-Bindungsreaktion (OIE-Empfehlung)	1
Zulassungsuntersuchungen/ Chargenprüfungen	2
Antigenherstellung (Ref.-Lab.)	1
Abgabe von Referenzmaterialien	15
Ringtests (Laborvergleichstest)	2

NATIONALE REFERENZLABORE FÜR BLAUZUNGENKRANKHEIT, EPIZOOTISCHE HÄMORRHAGIE DER HIRSCHEN UND AFRIKANISCHE PFERDEPEST

Hoffmann, B.

Das Bluetongue Virus (BTV), das Virus der Epizootischen Hämorrhagie (EHDV) und das Virus der Afrikanischen Pferdepest (AHSV) gehören zu den Orbiviren aus der Familie *Reoviridae*. Die doppelsträngige RNA liegt in zehn Segmenten vor. Momentan werden 24 Serotypen bei BTV, acht Serotypen bei EHDV und neun Serotypen bei AHSV unterschieden. Sowohl die doppelsträngige RNA als auch die vielen unterschiedlichen Serotypen sind für die Diagnostik von Orbiviren von besonderer Bedeutung. Im August 2006 wurde in Deutschland erstmalig BTV festgestellt. Hierbei handelte es sich um den BTV-Serotyp 8. Im November 2008 wurde an der Grenze zu den Niederlanden BTV vom Serotyp 6 festgestellt. 2008 breitete sich der Serotyp 1 in Südwestfrankreich in Richtung Norden weiter aus und stellt eine ständige Bedrohung für Deutschland dar. Im Jahre 2009 wurden nur wenige neue BTV-Fälle in Deutschland festgestellt (insgesamt 142). Für die Diagnostik von BTV stehen zugelassene ELISA-Kits und *Real-time*-RT-PCR-Systeme zur Verfügung. Die eingehende Prüfung im Rahmen der Zulassung und die Chargentestung dieser kommerziellen Diagnostika stellen einen wichtigen Aufgabenbereich des NRL-BT dar. Spezifische serologische und PCR-Tests zum Nachweis von BTV im Allgemeinen und für die Serotypen 8, 1 und 6 im Besonderen wurden entwickelt, validiert und teilweise den regionalen Laboren zur Verfügung gestellt. Das NRL-BT führte 2009 Ringtests zur Diagnostik von BTV mit allen regionalen Untersuchungseinrichtungen der Länder durch, um die Diagnostik von BTV zu standardisieren und zu harmonisieren.

	Anzahl
Einsendungen Referenzproben	296
Erregernachweise:	
BTV- <i>real-time</i> RT-PCR	1.771
AHSV- <i>real-time</i> RT-PCR	82
EHDV- <i>real-time</i> RT-PCR	57
Antikörpernachweise:	
BTV-ELISA	2.522
BTV-NT	73
AHSV-ELISA	148
Virusisolierungen: Zellkultur	48

Zulassungsuntersuchungen	5
Chargenprüfungen	21
Abgabe von Referenzmaterialien: BTV-positives Blut, Sera, RNA	37
BTV-Ringtests	2

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BOVINE HERPESVIREN VOM TYP 1 (BHV-1)

Beer M., König, P., Höreth-Böntgen, D.

Dem OIE und Nationalen Referenzlabor ist im Berichtszeitraum 2009 eine umfangreiche Anzahl von Proben zur BHV-1-Abklärung zugeführt worden. 1.558 Serum-, Plasma- und Milchproben aus 333 Einsendungen wurden im Zuge hoheitlicher Amtshilfe oder zu Forschungszwecken an das NRL weitergeleitet. Die Schwerpunkte lagen dabei auf dem Nachweis von gE-spezifischen Antikörpern sowie der serologischen Untersuchung ungeimpfter Tiere mit Hilfe von BHV-1-Antikörper-ELISAs und dem Neutralisationstest. BHV-1-Situation in Deutschland (Zahlen vom März 2009): Im Jahr 2008 wurden 3,68 Millionen Blutproben und 281.442 Milchproben serologisch auf BHV-1 untersucht. Im Bundesdurchschnitt waren 85,1 % der Bestände BHV-frei, 11 % waren Sanierungsbetriebe und 3,9 % wurden in die Kategorie „sonstige Bestände“ eingeordnet.

	Spezifizierung	Anzahl
Anzahl Einsendungen		333
Anzahl Erregernachweise	Anzucht, PCR	91
Anzahl Antikörpernachweise	5 unterschiedliche ELISA-Tests, SNT	3.878
Zulassungsuntersuchungen/ Chargenprüfungen		44
Abgabe von Referenzmaterialien	Referenzseren/ -milchproben	714
Ringtests		1

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BRUCELLOSE DER RINDER, SCHWEINE, SCHAFE UND ZIEGEN

Melzer, F., Neubauer, H.

Die Brucellose ist eine Infektionskrankheit, hervorgerufen durch Bakterien der Gattung *Brucella* (*B.*). Da der Erreger vom Rind (*B. abortus*), vom Schwein (*B. suis*), vom Schaf und von der Ziege (*B. melitensis*) und in eingeschränktem Maße auch vom Hund (*B. canis*) auf den Menschen übertragen werden kann, handelt es sich um eine Zoonose. Neben den genannten werden aktuell in der wissenschaftlichen Literatur folgende Spezies unterschieden: *B. ovis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* und *B. inopinata*. Deutschland ist als offiziell frei von der anzeigepflichtigen Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen anerkannt. Hauptsymptome der Brucellose beim Tier sind Aborte, Frühgeburten oder die Geburt toter, lebensschwacher und unterentwickelter Tiere. Beim männlichen Tier kommt es oft zu entzündlichen Veränderungen im Bereich des Genitaltraktes, v. a. der Hoden und Nebenhoden. Die Aufgabe des Referenzlabors umfasst insbesondere die Unterstützung der Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durch Abklärungsuntersuchungen bei positiven Befunden und die Zulassung bzw. Chargenprüfung von Diagnostika.

Im Rahmen der OIE-Referenzlabortätigkeit werden Abklärungsuntersuchungen bei positiven Befunden sowie Trainingskurse zur Rotzdiagnostik durchgeführt. Im Jahr 2009 gab es je einen Brucellose-Ausbruch in Schweinefreilandhaltungen in Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg. Einer dieser Ausbrüche konnte durch die Isolierung von *B. suis* Biovar 2 bakteriologisch bestätigt werden. Des Weiteren wurde Brucellose in einem Ziegenbestand angezeigt. Die Infektion mit *Brucella ovis* beim Schaf wird als eine gesonderte Erkrankung (Ovine Epididymitis) behandelt und fällt nicht unter die Regelungen der Brucellose-Verordnung.

	Anzahl
Einsendungen (Proben national und international)	1.820
Erregernachweise: Identifizierung und Typisierung von eigenen oder eingesendeten Isolaten	28
Antikörpernachweise (Abklärungsuntersuchungen, inklusive möglicher falsch positiver serologischer Reaktionen)	110
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen	1/12
Abgabe von Referenzmaterialien:	40
Teilnahme an/Organisation von nationalen und internationalen Ringversuchen	7/2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BSE

Balkema-Buschmann, A., Hoffmann, C., Eiden, M., Groschup, M.H.

Die Zahl der bestätigten Fälle von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) bei Rindern ist seit einigen Jahren rückläufig. 2008 und 2009 wurden jeweils nur noch zwei Fälle von BSE bei Rindern diagnostiziert. Somit kann festgestellt werden, dass die 2001 ergriffenen Maßnahmen zur Bekämpfung dieser Erkrankung (Verbot der Verfütterung tierischen Eiweißes an Säugetiere, Definition und Entfernung spezifizierter Risikomaterialien, großflächige BSE-Schnelltestuntersuchungen) wirksam sind. Aufgrund dieser positiven Entwicklung können die 15 „alten“ EU-Mitgliedsstaaten seit Anfang 2009 auf Antrag das Testalter für Schlachtrinder und Risikotiere (gefallene und not- bzw. krank geschlachtete Rinder) auf 48 Monate anheben. Somit sank die Zahl der in 2009 durchgeführten Schnelltest-Untersuchungen bei Rindern von ca. vier Millionen auf weniger als zwei Millionen. Zu den Aufgaben des nationalen Referenzlabors gehören auch die fachliche Begleitung und die Überwachung der 20 staatlichen und privaten Labors, die amtliche Schnelltest-Untersuchungen durchführen. Hierzu wurde im Jahr 2009 u. a. ein BSE-Ringversuch durchgeführt, der den hohen diagnostischen Standard dieser Schnelltest-Untersuchungen belegte.

Im nationalen Referenzlabor (NRL) für BSE wurden die praktischen Prüfungen im Rahmen der EU-weiten Evaluierungs- und Zulassungsverfahren (nach der EU-VO 999/2001) sowie der nationalen Zulassungsverfahren (nach der Tierimpfstoff-VO) für diagnostische Tests durchgeführt und hierzu gutachterliche Stellungnahmen verfasst. Dabei stützt sich das EU-Referenzlabor am VLA in Weybridge, VK zunehmend auf die praktische Prüfung der Testkits in einem festgelegten NRL innerhalb der europäischen Union und informiert alle übrigen NRLs über das Ergebnis dieser Prüfung. Somit kann für viele der freizugebenden Schnelltest-Kit-Chargen die praktische Prüfung am FLI entfallen. Andererseits führt das FLI die europaweit gültige Chargenprüfung für zwei der zugelassenen Schnelltestverfahren (BioRad TeSeE und Prionics Check LIA test) durch. Dies war mit einem erheblichen Mehraufwand verbunden, da zunächst die akzeptierbaren Varianzen der Messergebnisse für definierte Probensets ermittelt werden mussten und der vom CRL vorgeschriebene Untersuchungsumfang für eine EU-weite Chargenfreigabe umfangreicher ist als der bei einer nationalen Freigabe. Während für den BioRad TeSeE-Test die Voruntersuchungen abgeschlossen und bereits die erste Charge nach dem EU-Protokoll freigegeben werden konnte, dauern die Voruntersuchungen für den Prionics Check LIA test noch an.

Proben mit verdächtigen BSE-Schnelltest-Ergebnissen werden im NRL mittels der OIE-anerkannten Bestätigungsmethoden (siehe OIE „Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals“) abgeklärt. Hierzu gehören histopathologische, immunhistochemische oder proteinbiochemische (OIE-SAF-Immunoblot) Verfahren. Die Zuverlässigkeit dieser Bestätigungsuntersuchungen am FLI wurde durch die Teilnahme an drei Ringversuchen durch das CRL (ca. 2x pro Jahr und Testverfahren) und durch fortlaufende interne Kontrolluntersuchungen verifiziert.

Folgende Untersuchungen wurden im Jahre 2009 am nationalen BSE-Referenzlabor durchgeführt:

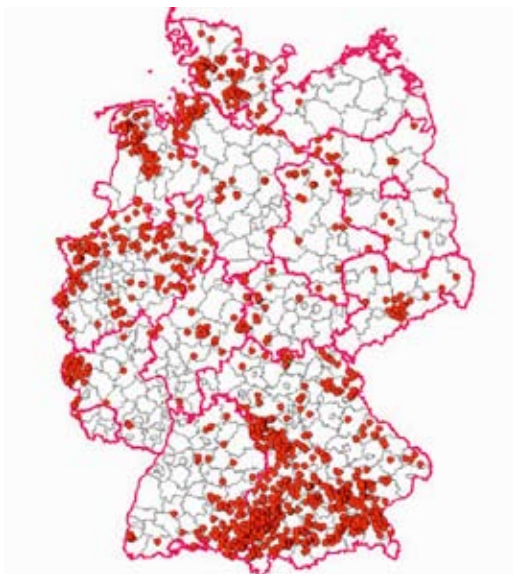
Rind	Spezifizierung	Anzahl
Anzahl Einsendungen		7
Anzahl Erregernachweise		2
Chargenprüfungen		36
Durchgeführte nationale Ringversuche		1
Teilnahme internationale Ringversuche		3

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BOVINE VIRUSDIARRHOE/ MUCOSAL DISEASE (NRL BVD/MD)

Schirrmeier, H.

Die Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD) ist seit November 2004 anzeigepflichtig. In der „Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV-Verordnung) vom 11. Dezember 2008, BGBl. 2008 Teil I Nr. 59, S 2461 v. 18. Dezember 2008 sind nunmehr die Grundsätze einer bundeseinheitlichen Bekämpfung der BVD auf verpflichtender Grundlage geregelt, sie tritt ab dem 01.01.2011 in Kraft

Im TSN sind für das Jahr 2009 1.462 Fälle von BVD/MD ausgewiesen, das sind nur 198 mehr als 2008. Es ist davon auszugehen, dass diese Zahl nicht die Anzahl festgestellter PI-Tiere widerspiegelt, da bei Feststellung mehrerer Fälle im Bestand in der Regel nur eine Anzeige erfolgt. Außerdem zeigen die Zahlen, dass die Anzeigepflicht immer noch unzureichend durchgesetzt ist. Bei einer angenommenen Prävalenz von PI-Tieren von zwischen 0,1 – 0,5 % in der NutZRinderpopulation ist mit einer etwa 10 – 50-mal höheren Zahl tatsächlicher Fälle zu rechnen.



	2005	2006	2007	2008	2009
SH:	51	651	188	129	88
NI:	250	231	202	245	152
NW:	51	53	56	64	166
HE:	16	17	18	14	25
RP:	5	16	38	58	52
BW:	21	38	89	97	133
BY:	439	492	613	564	731
SL:	1	1	0	1	1
BB:	47	25	23	18	21
MV:	5	54	8	9	1
SN:	14	9	14	19	25
ST:	57	33	47	44	38
TH:	6	3	3	7	28
Berlin			1	1	0
Bremen					1
Gesamt:	963	1623	1300	1270	1462

BVD-Fälle in Deutschland 2009, Angaben aus TSN

	Spezifizierung	Anzahl
Anzahl Einsendungen		80
Anzahl Erregernachweise/ -charakterisierungen		180
Anzahl Antikörperrnachweise		210
Zulassungsuntersuchungen/ Chargenprüfungen		27
Abgabe von Referenzmaterialien	Erfolgt über Virusbank	ca. 20

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR BUNYAVIREN (I.E. HANTAVIREN)

Ulrich, R.G.

Hantaviren, Familie *Bunyaviridae*, sind Zoonoseerreger, die von persistent infizierten Nagetieren auf den Menschen übertragen werden. In Europa kommen mindestens drei humanpathogene Hantavirus-Spezies vor, die unterschiedlich schwere Verläufe des hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom hervorrufen können. Mehr als 90 Prozent der bisher in Deutschland gemeldeten humanen Hantavirus-Infektionen wurden durch das *Puumalavirus* (PUUV) verursacht. Weitere in Deutschland vorkommende Hantaviren sind das *Dobrava-Belgrad-Virus* (DOBV) und das *Tulavirius* (TULV). Bisher ist nicht bekannt, ob landwirtschaftliche Nutztiere durch Hantaviren infiziert werden können und erkranken. Zur Überwachung der Hantavirus-Situation wird im Rahmen des Netzwerkes „Nagetier-übertragene Pathogene“ ein Monitoring von Nagetier-Reservoirwirten durchgeführt. Dieses Monitoring konzentriert sich insbesondere auf Wildnager aus Hantavirus-Ausbruchsgebieten in Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen und Bayern, aber auch auf Gebiete in anderen Bundesländern. Nach einem serologischen Screening von Transsudat-Proben mittels IgG-ELISA unter Verwendung homologer rekombinanter Antigene erfolgt anschließend eine RT-PCR-Analyse von Lungenproben der Nagetiere (Tabelle).

	Spezifizierung	Anzahl
Einsendungen	Nagetiere und andere Kleinsäuger	ca. 3.100
Erregernachweis	Anzucht RT-PCR Sequenzanalyse	Keine 251 57
Antikörperrnachweis	PUUV-ELISA DOBV-ELISA TULV-ELISA	649 393 330

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR CAMPYLOBACTERIOSE (THERMOPHILE CAMPYLOBACTER)

Hotzel, H.

Durch Bekanntmachung vom 05. Dezember 2008, veröffentlicht im Bundesanzeiger vom 24. Dezember 2008, wurde das FLI als Betreiber des NRL für Campylobacteriose

(thermophile *Campylobacter*) als meldepflichtige Tierkrankheit benannt.

Thermophile *Campylobacter*-Spezies kommen bei vielen Tierarten und beim Menschen vor. Beim Menschen sind sie eine der Hauptursachen für infektiöse Darmerkrankungen. In Deutschland wird von mehr als 60.000 gemeldeten *Campylobacter*-Fällen pro Jahr beim Menschen berichtet; damit kommt die *Campylobacter*-Infektion inzwischen sogar häufiger vor als die Salmonellose. Auch bei Rind, Schaf, Schwein, Wildwiederkäuern, Hund, Katze und vor allem Geflügel besiedeln die Bakterien die Darmschleimhaut, werden mit dem Kot ausgeschieden, verursachen jedoch nur selten Erkrankungen. Bei Jungtieren können die Bakterien Entzündungen des Verdauungstraktes mit Durchfällen auslösen. Außerdem führt der Erreger bei Säugern gelegentlich zu Aborten, beim Geflügel zu Leberentzündungen.

Die Bakterien benötigen zum Wachstum spezielle Nährmedien und eine mikroaerophile Atmosphäre. Nach der Anzucht werden sie biochemisch und molekularbiologisch identifiziert und typisiert. Ebenfalls möglich ist der molekularbiologische Direktnachweis von *Campylobacter*-Spezies aus verschiedenen Materialien.

	Anzahl
Einsendungen Referenzproben	68
Erregernachweis	68

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR CAPRINE ARTHRITIS/ENZEPHALITIS UND MAEDI/VISNA

Vahlenkamp, T.W.

Das Caprine Arthritis-Enzephalitis Virus (CAEV) gehört in der Familie der *Retroviridae* zum Genus *Lentivirus* und ist der Erreger der Caprinen Arthritis-Enzephalitis (CAE), einer progressiv verlaufenden, chronischen Infektionskrankung bei Ziegen. Das CAEV ist mit dem Maedi-Visna Virus (MVV) der Schafe nahe verwandt. Beide Viren besitzen ein gemeinsames Gruppenantigen. Die Inkubationszeit kann mehrere Jahre betragen. Nur etwa 30 Prozent der infizierten Tiere zeigen schließlich klinische Symptome. Ähnlich wie beim MVV kann die Übertragung des CAEV durch Milch, aber auch durch infizierte und virushaltige Sekrete der betroffenen Tiere erfolgen. In der Bundesrepublik bestehen in einzelnen Bundesländern freiwillige Bekämpfungsprogramme gegen CAE. Infektionen werden durch den Nachweis von Antikörpern gegen CAEV

und MVV mittels ELISA nachgewiesen. Einsendungen von Geweben werden zur differentialdiagnostischen Abklärung in der Pathologie immunhistologisch untersucht.

	Anzahl
Einsendungen / Referenzproben	24
Erregernachweise: PCR	0
Antikörpernachweise (ELISA)	155
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen (ELISA)	6
Ringtest Serologie (CAEV/MVV)	0

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR ECHINOKOKKOSE

Conraths, F.J., Schwarz, S., Sutor, A.

Infektionen von Menschen mit dem Larvenstadium des Kleinen Fuchsbandwurms *E. multilocularis* gelten als die gefährlichste parasitär bedingte Zoonose Mitteleuropas. Infektionen bei Tieren mit *Echinococcus* spp. sind seit dem 9. November 2004 (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten) meldepflichtig. *E. multilocularis* hat einen obligaten Wirtwechselzyklus. Infizierte Endwirte (*Canidae*, auch *Felidae*; in Europa vor allem der Fuchs und zunehmend auch der Marderhund) beherbergen wenige bis zu mehreren 100.000 geschlechtsreife, 1-3 Millimeter kleine Bandwürmer im Dünndarm und scheiden die auch für den Menschen infektiösen Eier mit der Losung aus. Diese bleibt über Monate an der bodennah wachsenden Vegetation infektiös. Natürliche Zwischenwirte sind Nager, die sich durch orale Aufnahme der Eier infizieren und das Larvenstadium in nahezu allen Fällen in der Leber beherbergen. Der Lebenszyklus schließt sich über die Räuber-Beute-Beziehung der End- und Zwischenwirte.

	Anzahl
Einsendungen	2.815
Erregernachweise	189

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR ENZOOTISCHE LEUKOSE DER RINDER

Vahlenkamp, T.W.

Das bovine Leukosevirus (BLV) gehört in der Familie der *Retroviridae* zum Genus *Delta-Retrovirus* und ist der Erreger der enzootischen Leukose der Rinder (enzootic bovine leukosis, EBL). Das Virus persistiert primär in B-Lymphozyten und zu geringeren Anteilen in CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten. Klinisch werden drei Verlaufsformen unterschieden: inapparente Infektion, persistierende Lymphozytose und tumoröse Leukose. Die Prävalenz der EBL ist in vielen Ländern Europas durch erfolgreiche serologische Sanierungsprogramme mittels ELISA und Agargelimmundiffusionstest zurückgegangen, allerdings ist die Infektion in Portugal, Ungarn, Bulgarien, Rumänien, Griechenland, Estland, Lettland, Litauen sowie in bestimmten Gebieten Italiens und Polens verbreitet. Außerhalb der EU ist die Erkrankung vor allem in Osteuropa, Asien, Australien sowie in Nord- und Südamerika von wirtschaftlicher Bedeutung. In diesen Ländern beträgt der Anteil infizierter Tiere in den Beständen z. T. bis zu 60 Prozent.

	Spezifizierung	Anzahl
Einsendungen Referenzproben		28
Erregernachweise (PCR)		51
Antikörpernachweise	ELISA	121
	AGID	25
Zulassungsuntersuchungen/ Chargenprüfungen	Chargenprüfung ELISA	9
	Chargenprüfung AGID	1
Abgabe von Referenzmaterialien	E05 OIE Referenzserum; Versand in verschiedene Länder	18
Ringtests (Serologie/PCR)		2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR EQUINE ENZEPHALOMYELITIDEN

Keller, M., Wohlfromm, W., Groschup, M.H.

Im Nationalen Referenzlabor für Equine Enzephalomyelitiden werden Erkrankungen untersucht, die durch das venezolanische (VEE), östliche (EEE) und westliche (WEE) Pferdeenzephalomyelitivirus verursacht werden. Die auslösenden

Viren gehören dem Genus *Alphavirus* aus der Familie *Togoviridae* an und werden in die Gruppe der Arboviren eingeordnet, da sie über Stechmücken übertragen werden. Das Hauptreservoir bilden Vögel, bzw. im Falle des VEEV auch kleine Säugetiere, die selbst nicht oder nur leicht erkranken. Pferde und Menschen sind für EEEV und WEEV sogenannte Fehlwirte, von denen keine erneute Infektion ausgeht. Diese Infektionen verlaufen meist asymptomatisch, können aber auch mit massiven zentralnervösen Schädigungen und dem Tod einhergehen. Im Falle von VEEV kommt es ebenfalls meist zu milden Verlaufsformen, allerdings können Pferde und Menschen auch als Infektionsquelle fungieren.

Das Nationale Referenzlabor wendet verschiedene molekularbiologische und biochemische Methoden in Kombination an, um diese anzeigepflichtigen Krankheiten sicher identifizieren und differenzieren zu können. Während einer akuten Virämie ist der Nachweis des viralen Genoms in Proben aus dem zentralen Nervensystem mittels einer „Nested“-RT-PCR möglich, wobei Primer eingesetzt werden, die spezifisch für die einzelnen Viren sind. Neben diesem qualitativen Genom-Nachweis wurden quantitative RT-PCRs etabliert, die auch eine Aussage über die Viruslast der eingesandten Proben erlauben. Um eine Aussage über den serologischen Status eines eventuell infizierten Organismus machen zu können, wurden zwei ELISA-Systeme für EEEV und VEEV etabliert. Zum einen wurde ein ursprünglich am OIE-Referenzlabor in Ames/Iowa etablierter IgM-ELISA weiterentwickelt. Mit diesem Test kann eine akute Infektion von Pferden mit EEEV bzw. VEEV nachgewiesen werden. Zum anderen wurde ein neuer kompetitiver ELISA entwickelt, der auch eine speziesübergreifende Diagnose erlaubt. Mit beiden ELISA-Testsystemen wurden Pferdeseren aus verschiedenen Teilen Deutschlands getestet und erwartungsgemäß keine positiven Befunde erhalten. Derzeit ist eine Validierung dieser beiden ELISAs mit serologisch (PRNT) charakterisierten Proben in Zusammenarbeit mit dem OIE-Referenzlabor in Vorbereitung. Da diese geschilderten Testsysteme inaktiviertes Vollvirus als Antigen erfordern, laufen Untersuchungen zur Verwendung rekombinanter Hüllproteine.

NATIONALE REFERENZLABORATORIEN FÜR DIE FISCHSEUCHEN VHS, IHN, ISA, KHV-INFEKTION, EHN UND EUS

Fichtner, D., Bergmann, S.M., Kotterba, G., Schütze, H.

Die Nationalen Referenzlaboratorien (NRL) für Fischseuchen haben die Diagnose virusbedingter Krankheiten der Fische auf der Grundlage der Fischseuchen-Verordnung und der

Gesetzgebung der Europäischen Union (EU) zu koordinieren und zu sichern. Anzeigepflichtige Fischseuchen sind die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) und die Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN), zwei für Forellen bedeutende Seuchen, die Infektiöse Anämie der Lachse (ISA) und die Koi-Herpesvirus (KHV)-Infektion (KHV-I) der Karpfen. Sie sind in der Liste der nicht-exotischen Krankheiten der Fische in der „EU-Richtlinie 2006/88/EG aufgeführt. Anzeigepflicht besteht in Deutschland auch für die in der Liste der exotischen Fischkrankheiten dieser Richtlinie genannten Fischseuchen Epizootische Hämato-poetische Nekrose (EHN) und das Epizootische Ulzerative Syndrom (EUS). 2009 wurden in den NRLs 38 Einsendungen untersucht (Anzahl der Proben und nachgewiesene Viren s. Tabelle).

2009 wurden in Deutschland wieder 36 VHS-Neufeststellungen und fünf IHN-Neuausbrüche angezeigt und im Tierseuchen-Nachrichtensystem (TSN) erfasst. Entsprechend den Vorschriften aus der Richtlinie 2006/88/EG erfolgten epizootiologische Untersuchungen auf der Grundlage der genetischen Analyse von Virusisolaten durch Sequenzierung ausgewählter Genombereiche zur Ermittlung der Verbreitungs- und Einschleppungswege von VHS- und IHN-Viren.

Das KHV verursacht weiterhin verlustreiche Krankheitsgeschehen bei Kulturkarpfen (*Cyprinus carpio*) und bei Kois (*Cyprinus carpio*). 2009 wurden in Deutschland 107 Neuausbrüche, davon 21 Fälle bei Nutzkarpfen und zwei bei anderen Cypriniden angezeigt. Im NRL wurden weitere PCR-Methoden (real time-PCR, semi-nested-PCR, Duplex-PCR) zum Nachweis von KHV-Genom etabliert und validiert. Ergänzend zum KHV-Genomnachweis wurden Untersuchungen zum indirekten Nachweis der KHV-I durch Feststellung von Antikörpern gegen KHV mittels ELISA und Serum-Neutralisations-Test (SNT) durchgeführt. Beim SNT konnten Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Karpfepocken-Virus durch Untersuchung der Seren experimentell infizierter Karpfen und eingesandter Feldseren ausgeschlossen werden. Bei der Entwicklung eines ELISA zur Detektion von KHV-Antikörpern liegen erste Ergebnisse vor.

Bezüglich ISA wurde Deutschland 2009 von der EU-Kommission als seuchenfrei erklärt. Vereinzelt wurden Forellenbestände mittels vom NRL vorgegebenen Methoden mit negativem Ergebnis untersucht.

Zum Nachweis des Erregers der exotischen Fischseuche EHN wurden die diagnostischen Methoden etabliert. Derzeit sind in Deutschland keine EHN-Erkrankungen registriert.

Im NRL für EUS wurden die Voraussetzungen für die Etablierung der Diagnose-Methoden aus dem OIE-Manual geschaffen. Das für die EUS-Diagnostik benötigte positive Referenzmaterial konnte bisher weder vom EU- noch vom OIE-Referenzlabor für EUS zur Verfügung gestellt werden.

Beim jährlichen Treffen der Vertreter der nationalen Referenzlaboratorien für Fischkrankheiten aus den Mit-

gliedsländern der EU wurde eine Analyse über Umfang und Struktur der Aquakultur, über Daten zur Epizootiologie, Diagnose und Bekämpfung der VHS, IHN, ISA, KHV-I und SVC (Frühlingsvirämie der Karpfen/Spring Viraemia of Carp) sowie über Umfang und Ergebnisse der Laboruntersuchungen zu virusbedingten Fischkrankheiten in Deutschland vorgelegt.

Anzahl Einsendungsproben	8x Forelle; 197x Karpfen, 30x Koi-Karpfen, 10x Goldfische, 24x Aal, 44x Stör, 2x Plötze, 1x Saibling	316
Anzahl Erregernachweise	2x VHSV, 8x KHV, 3x KHV beim Goldfisch, 1x KHV bei Plötze, 72x KHV-Antikörper, 32x KPoV-Antikörper, 11x HVA, 12x EVE, 2x Aal-Picornaviren; 3x Stör-Iridovirus, 10x Stör-Herpesvirus, 4x CyHV-2	160
Chargenprüfungen	Anti-ISAV-mAk	1
Abgabe von Referenzmaterialien	VHSV, IHN, IPNV, KHV, KHV-DNA, IPNV-Antiserum, HVA-Antiserum	10
Ringtests (EU-Referenzlabor)	Identifizierung und Genotypisierung IHN, VHSV and EHN	1

KPoV Karpfepockenvirus; EVE europ. Aalvirus; IPNV Infektiöse-Pankreasnekrose-Virus; HVA Aalherpesvirus

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR INFEKTIOSE ANÄMIE DER EINHUFER

König, P.

Die Infektiöse Anämie der Einhufer, auch bezeichnet als Equine infektiöse Anämie (EIA) oder Ansteckende Blutarmut der Einhufer, ist eine weltweit auftretende Viruserkrankung der Pferde, Ponys, Esel, Maultiere und Zebras. Der Erreger (EIAV), ein Lentivirus aus der Familie der Retroviren, verursacht eine lebenslang persistierende Infektion. Die Diagnosestellung der EIAV-Infektion erfolgt durch den Nachweis von Antikörpern. Im Jahr 2009 wurden ein kommerzieller Agargel-Immudiffusionstest und zwei ELISA-Tests neu zugelassen.

In Deutschland wurden im Jahr 2009 insgesamt vier Ausbrüche verzeichnet. Zehn Pferde wurden EIAV-positiv befundet.

	Spezifizierung	Anzahl
Anzahl Einsendungen		8
Anzahl Erregernachweise	RT-/ PCR	17
Anzahl Antikörpernachweise	AGID (2 Hersteller) ELISA (2 Hersteller)	139
Zulassungsuntersuchungen/ Chargenprüfungen		6
Abgabe von Referenzmaterialien		0
Ringtests		1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR JAPAN-ENZEPHALITIS-VIRUS (JEV)

Groschup, M.H., Ziegler, U.

Das Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV) gehört wie die Dengue-Viren, die Gelbfieber-Viren oder die West-Nile-Viren zur Familie der Flaviviren. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen Plus-Strang-RNA von ca. 11 kb (Kilobasen) Größe. Auf dieser ist die Information für drei Strukturproteine (Kapsel-, Membran- und Hüllproteine) und sieben Nichtstrukturproteine (Enzyme) kodiert. Japanische Enzephalitis tritt nicht nur in Japan auf, sondern auch in anderen Ländern der gemäßigten und tropischen Zone Südost-Asiens. Jährlich sterben dort 30.000 bis 50.000 Menschen an solchen Infektionen. Schwerpunkte sind dabei ländliche Regionen mit Reisproduktion und Schweinezucht. Infektionen kommen aber auch in urbanen Regionen in entwickelten Ländern Asiens vor. Das Virus wird durch Mückenstiche übertragen. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht möglich. Das Virus befällt auch Haustiere wie Pferde, Schweine oder Hunde. Über 95 Prozent der Infektionen beim Menschen verlaufen asymptomatisch, fünf Prozent der Infizierten entwickeln Enzephalitiden (oft mit neurologischen Spätschäden), wovon jeder 200. Fall tödlich endet.

Das NRL konnte Serum von sechs geimpften Pferden gewinnen, die aufgrund der Olympiadeteilnahme 2008 mit einem inaktivierten JEV-Impfstoff vakziniert waren. Dieses Referenzmaterial dient zunächst für serologische Spezifitätsprüfungen mit anderen Flaviviren (z. B. WNV), soll aber auch perspektivisch mit geeigneten serologischen Methoden auf das Vorhandensein von JEV-Antikörpern untersucht werden. Weiterhin wurde am NRL ein quantitativer *real-time* RT-PCR-Assay etabliert.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR KLASSISCHE SCHWEINEPEST

Blome, S., Strebelow, G.

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine weltweit vorkommende, verlustreiche Tierseuche mit großer handelspolitischer und ökonomischer Relevanz. Sie zählt zu den Krankheiten, die bei der Weltorganisation für Tiergesundheit, dem Office International des Epizooties (OIE), und in allen europäischen Staaten anzeigepflichtig sind. Innerhalb der EU besteht seit 1990 ein striktes Verbot der prophylaktischen Impfung, wobei Notimpfungen durch die EU gestattet werden können. Die KSP wird

durch ein kleines, behülltes RNA-Virus aus dem Genus *Pestivirus* hervorgerufen. Natürliche Wirte des Virus sind ausschließlich Haus- und Wildschweine. Da das klinische Bild sehr variabel sein kann, müssen zur Bestätigung der Erkrankung labordiagnostische Methoden verwendet werden. Die Aufgaben des Referenzlabors für Klassische Schweinepest (KSP) sind im Anhang III der EU Richtlinie 2001/89 festgelegt und ergeben sich darüber hinaus aus dem Tierseuchengesetz.

Nach über einem Jahr ohne KSP-Fälle in der Wildschweinpopulation wurde am 8. Januar 2009 die Wildschweinepest in Nordrhein-Westfalen festgestellt. Der erste Fall war ein krank angetroffener Frischling in der Nähe der Stadt Rösrath. Weitere Fälle betrafen die umliegenden Gebiete und den nördlichen Teil von Rheinland-Pfalz. Restriktionszonen wurden gemäß EU Richtlinie 2001/89 festgelegt und man entschied sich für die orale Immunisierung der betroffenen Wildschweinpopulationen. Die Impfkampagnen starteten im Februar 2009.

Ein zweites Ausbruchsgeschehen wurde im März 2009 in der Pfalz detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um ein unabhängiges Geschehen handelte, da sich der gefundene Virustyp deutlich von dem des anderen Geschehens unterschied.

Die Hausschweinpopulation war 2009 nicht von der KSP betroffen.

		Anzahl
Erregernachweise	Hausschweineseren	22
	Wildschweineseren	96
Antikörpernachweise	Hausschweineseren	41
	Wildschweineseren	82
Zulassungsuntersuchungen/ Chargenprüfungen		
	Antikörper ELISA	15
	Antigen ELISA	1
	Konjugate	1
	Antikörper	2
	Impfstoffe	9
Abgabe von Referenzmaterialien (Standardseren)		11
Teilnahme am EU Ringtest 2009		1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR KONTAGIÖSE EQUINE METRITIS

Melzer, F., Raßbach, A.

Die Kontagiöse Equine Metritis (CEM: Contagious Equine Metritis) ist eine bakterielle Deckinfektion beim Pferd, hervorgerufen durch das Bakterium *Taylorella equigenitalis*. Das klinische Bild wird durch mukopurulenten Vaginalausfluss als Zeichen einer bestehenden Zervix- und Vaginalentzündung bei der Stute bestimmt und kann zu temporärer Infertilität führen. Auch wenn keine klinischen Zeichen auftreten, können die Tiere den Erreger ausscheiden und beim Deckakt auf den Hengst übertragen, der seinerseits asymptomatisch bleibt und die Infektion weiter übertragen kann. Die Diagnostik erfolgt durch die Entnahme von Genitalupferproben bei Stuten und Hengsten zur Anzucht des Erregers. Diese Untersuchung wird vor dem Export oder bei Überwachungsuntersuchungen von Zuchtpferden in privaten und staatlichen Laboren durchgeführt. Im Jahr 2009 wurden sieben Bestände gemeldet, in denen *T. equigenitalis* Infektionen bei insgesamt zehn Tieren nachgewiesen worden waren.

	Spezifizierung	Anzahl
Anzahl Einsendungen Referenzproben	zur Bestätigung der Diagnostik	9
Anzahl Erregernachweise	Identifizierung der eingesendeten Isolate	8
Zulassungsuntersuchungen / Chargenprüfungen		0
Abgabe von Referenzmaterialien	Biomassen von <i>Taylorella</i> -Stämmen als Positivkontrollen	17
Ringtests	Teilnahme und logistische Unterstützung von internationalen Ringversuchen	1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR KREBSTIERKRANKHEITEN

Fischer, U., Bergmann, S.M.

Das nationale Referenzlabor für Krebstierkrankheiten hat die Diagnose der Weißpünktchenkrankheit (White Spot Disease), des Taura-Syndroms und der Gelbkopfkrankheit (Yellowhead Disease) auf der Grundlage der Richtlinie 2006/88/

EG des Rates vom 24. Oktober 2006 mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten (ABl. EU Nr. L 328 S. 14) sowie der Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (BGBl. I S. 2315) in Deutschland zu etablieren, zu koordinieren und abzusichern. Unterstützt wird das NRL für Krebstierkrankheiten des FLI durch das Referenzlabor der Europäischen Gemeinschaft (Community Reference Laboratory, CRL) in Weymouth. Krebstierkrankheiten spielen in Deutschland gegenüber anderen melde- und anzeigepflichtigen Tierseuchen angesichts der nur dreizehn Betriebe, in denen Edelkrebse (*Astacus astacus*), Signalkrebse (*Pacifastacus leniusculus*) und Amerikanische Flusskrebse (*Orconectes limosus*) gehalten werden, eine bislang untergeordnete Rolle. Lediglich vier Haltungen sind Haupterwerbsbetriebe. Die anzeigepflichtigen Krebstierkrankheiten sind weltweit jedoch von großer wirtschaftlicher Bedeutung in der Shrimphaltung. Diese soll in Deutschland in Warmwasseranlagen (Kraftwerke) stufenweise ausgebaut werden. Zudem stellen nicht überwachte und als Angelköder verwendete Shrimps eine Gefahr für die Krebstierpopulation in Wildgewässern und angeschlossenen Krebstierfarmen dar.

Das NRL für Krebstierkrankheiten hat die von der OIE vorgeschlagene und vom CRL bisher erarbeitete Diagnostik etabliert. Anfang 2010 ist ein Workshop am CRL geplant. Die vom CRL erarbeiteten und empfohlenen Methoden sollen in die Diagnostik der Landesuntersuchungseinrichtungen überführt werden, vorzugsweise in solche, in deren Einzugsgebiet sich Krebstierzuchtanlagen befinden.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR DIE LUNGENSEUCHE DER RINDER

Heller, M., Schubert, E.

Bei der Lungenseuche der Rinder handelt es sich um eine anzeigepflichtige, hochkontagiöse respiratorische Erkrankung der Rinder, die vor allem in afrikanischen Ländern des Subsahara-Gebietes zu gravierenden wirtschaftlichen Verlusten führt. Deutschland ist seit vielen Jahren frei von Lungenseuche.

Die Erkrankung wird hervorgerufen durch das zellwandlose Bakterium *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type (*MmmSC*). Die amtliche Feststellung eines Lungenseucheausbruchs erfolgt ausschließlich über direkten Erregernachweis mittels kultureller Anzucht oder Genomnachweis durch PCR. Positive serologische Nachweise führen zum Verdacht. Laut OIE-Manual (Handbuch der OIE) sind Komplementbindungsreaktion und cELISA

die vorgeschriebenen Verfahren zum spezifischen Antikörpernachweis.

Im Berichtszeitraum erfolgte vom Landeslabor Hessen in Gießen die Einsendung einer Verdachtsprobe von einem verendeten Rind mit fibrinöser Pleuropneumonie, deren patho-morphologisches Bild den differentialdiagnostischen Ausschluss von Lungenseuche erforderte. Die bakterielle Untersuchung ergab dann allerdings eine massive Infektion mit *Mannheimia haemolytica*. Die Lungenseuchediagnostik fiel bei allen angewendeten Tests negativ aus (cELISA, Immunoblottingtest, kulturelle Erregeranzucht, PCR). Infektionen mit *Mannheimia haemolytica* führen mitunter zu fibrinösen Pleuropneumonien, die mit der Lungenseuche verwechselt werden können.

Unter der Leitung des NRL wurde auch 2009 die Aktualisierung des bundeseinheitlichen Tierseuchenbekämpfungshandbuchs im Rahmen der Task Force Tierseuchenbekämpfung fortgeführt und ein Arbeitstreffen in Weimar einberufen.

2009 wurde vom NRL Lungenseuche ein weiterer Ringversuch zur serologischen Lungenseuchediagnostik mittels KBR organisiert. Teilnehmer waren die vom zuständigen Ministerium festgelegten Landesuntersuchungsämter. Alle 16 Teilnehmer haben den Ringtest bestanden, wengleich drei Teilnehmer erst nach erneuter Durchführung des Tests die erforderliche Sensitivität erreichten. Weiterhin nahm das NRL an einem internationalen Ringtest teil, der vom OIE-Referenzlabor für die Lungenseuche des Rindes in Frankreich (Montpellier) organisiert wurde. Dabei wurden sowohl serologische Tests (cELISA, KBR und Immunoblottingtest) als auch der Erregernachweis mittels kultureller Anzüchtung einschließlich Keimzählung sowie PCR und real-time PCR angeboten. Alle angebotenen Tests wurden vom NRL durchgeführt und bestanden. Die KBR wurde nicht bewertet, da die Verwendung unterschiedlicher Antigene sowie sonstiger Reagenzien einen realen Vergleich nicht zuließ. Eine weitere internationale Standardisierung der KBR unter Verwendung einheitlicher Reagenzien ist deshalb erforderlich. Dasselbe gilt zum Teil auch für den Immunoblottingtest.

	Anzahl
Einsendungen Referenzproben: <i>Mmm</i> SC-Feldstämme, Seren, Lungengewebe, Lymphknotengewebe, Nasentupfer	296
Erregernachweise: PCR oder Kultur	2
Antikörpernachweise: KBR /cELISA	623
Zulassungsanträge und Anträge auf Chargenprüfung <i>M. synoviae</i> , <i>M. gallisepticum</i> (Schnellagglutinationstest), <i>M. meleagridis</i> (Antikörper-ELISA), z. T. in Bearbeitung	5
Anträge auf Chargenprüfungen	1

Änderungsanzeigen	2
Abgabe von Referenzmaterialien: Kontrollseren, Mykoplasma-Typstämme, Antiseren	46
Ringtests	2
Anzahl Einsendungen sonstiger Proben zur Mykoplasmandiagnostik: Kultur, IFT, PCR, Sequenzierung, KBR	512

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR MAUL- UND KLAUENSEU- CHE, VESIKULÄRE SCHWEINE- KRANKHEIT UND STOMATITIS VESICULARIS

Haas, B.

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine fieberhafte Allgemeinerkrankung der Klautiere. Sie kommt noch in vielen außereuropäischen Ländern vor, insbesondere in der Türkei sowie in Asien, Afrika sowie Südamerika, und gehört wegen ihrer potentiell katastrophalen Auswirkungen auch heute noch zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Tierseuchen. Ihre besondere Bedeutung beruht auf ihrer hohen Kontagiosität sowie auf den wirtschaftlichen Verlusten infolge der zu ihrer Bekämpfung erforderlichen drastischen Sperr- und Kontrollmaßnahmen. Durch die Zunahme, Beschleunigung und Liberalisierung des internationalen Handels und Reiseverkehrs und die große Zahl der potentiellen Kontaktbetriebe bei der heutigen Struktur der Landwirtschaft sind die Bedingungen für eine Einschleppung und explosive Ausbreitung in Europa und damit auch in Deutschland jederzeit gegeben.

Im nationalen Referenzlabor für MKS werden gleichzeitig die Referenzlaboraufgaben für die differenzialdiagnostisch bedeutsamen Tierseuchen vesikuläre Schweinekrankheit (SVD) und Stomatitis vesicularis wahrgenommen. Die wichtigste Aufgabe des nationalen Referenzlabors für MKS ist die unverzügliche labordiagnostische Abklärung von MKS-Verdachtsfällen. Bei einem Ausbruch ist anschließend das isolierte Virus zu charakterisieren, um ggf. Empfehlungen für einen Impfstoff abgeben zu können. Wenn es gelungen ist, die Seuche zum Stillstand zu bringen, müssen serologische Untersuchungen die Entscheidungen über die Aufhebung von Sperrmaßnahmen unterstützen.

	Anzahl
MKS/SVD-Verdachtsfälle und DD Abklärungen	365
MKS (Import/Export/Status), Serologie	5
SVD (Import/Export/Status), Serologie	261
Stomatitis vesicularis (Import/Export), Serologie	397
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen	1
Ringtests (MKS-Serologie für Veterinäruntersuchungsämter)	1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR MILZBRAND

Elschner, M.

Milzbrand ist eine durch das Bakterium *Bacillus anthracis* verursachte ansteckende und oft tödlich verlaufende anzeigepflichtige Tierkrankheit mit zoonotischem Potential. Gefährdet sind insbesondere pflanzenfressende Nutz- und Zuchttiere. Hauptinfektionsquellen sind die Sporen von *B. anthracis*, die von Tieren über das Futter aufgenommen werden. Bei den klinischen Verlaufsformen bei Mensch und Tier unterscheidet man abhängig von dem jeweiligen Eintrittsort Hautmilzbrand, Lungenmilzbrand oder Darmmilzbrand. Die Erkrankung kommt bevorzugt in wärmeren Klimazonen (Südosteuropa, Südamerika, Afrika, Südostasien) vor, in Deutschland dagegen nur noch sporadisch. Risikogebiete sind Flussniederungen, die häufigen Überschwemmungen ausgesetzt sind. Weitere Infektionsquellen sind tierische Rohprodukte ausländischer Herkunft wie beispielsweise trockene Häute oder Felle von Ziege, Schaf, Rind und Pferd und die von diesen Tieren gewonnenen Haare, Wolle oder Schweinsborsten. Der Erregernachweis erfolgt durch Anzucht mit nachfolgender Identifizierung der Virulenzplasmide mittels molekularbiologischer Methoden.

	Anzahl
Einsendungen national	2
Erregernachweise: Identifizierung von eingesendeten Isolaten	2
Abgabe von Referenzmaterialien	24
Teilnahme an nationalen und internationalen Ringversuchen	4

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR MUSCHELKRANKHEITEN

Bergmann, S. M., Fichtner, D.

Das Nationale Referenzlabor für Muschelkrankheiten (NRL-Mu) hat die Aufgabe, die Diagnose auf der Grundlage der deutschen Fischseuchen-Verordnung (Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008) und der Gesetzgebung der Europäischen Union (CD 2006/88/EC) zu koordinieren und zu sichern.

Anzeigepflichtige, nicht exotische parasitäre Erkrankungen der Muscheln sind die Bonamiose, verursacht durch *Bonamia ostrea* sowie die Marteiliose mit *Marteilia refringens* als auslösendes Agens. Für das Gebiet der EU exotisch sind die Infektionen mit den Parasiten *Bonamia exitiosa* (Australien), *Perkinsus marinus* (USA, Europa) und *Mikrocytos mackini* (USA).

Die Diagnose wird histologisch mit Abklatschpräparaten nach Hemacolor®-Färbung oder in HE-gefärbten Paraffinschnitten gestellt. Für die Bonamiose und die Marteiliose stehen dem NRL PCRs, *In-situ*-Hybridisierungen und andere Nachweistechiken zur Verfügung.

Das NRL nahm erfolgreich an zwei Ringtests mit je 30 Präparaten (einheimische und exotische Erkrankungen) teil.

2009 wurden zwei Einsendungen bearbeitet. In Herzmuscheln (*Cerastoderma edule*) aus Irland wurde mittels PCR *Bonamia ostrea* (Microcell-PCR, Cochennec et al., 2001) nachgewiesen. In Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) aus dem Wattenmeer in Niedersachsen konnten keine anzeigepflichtigen Parasiten gefunden werden.

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR NEWCASTLE DISEASE (ND)

Grund, C.

Die Newcastle Disease ist eine hochkontagiöse Infektionskrankheit des Geflügels, die weltweit vorkommt und durch das Aviäre Paramyxovirus 1 (APMV-1) oder auch Newcastle Disease Virus (NDV) ausgelöst wird. Im Jahre 2009 wurden 41 ND-Ausbrüche aus 14 Ländern an die OIE gemeldet. In Deutschland war im Jahr 2009 kein ND-Ausbruch zu verzeichnen.

Insgesamt wurden im NRL ND 73 Proben auf das Vorliegen von Aviären Paramyxoviren (APMV) untersucht, von denen 63 von nationalen Untersuchungseinrichtungen

stammten. In 38 der nationalen Proben wurden APMV-1 nachgewiesen. Die von Geflügel isolierten Viren wurden als NDV-Impfstämme identifiziert und stammten von Hühnern (7), einer Pute sowie einer Rabenkrähe. Der überwiegende Teil der APMV-1-positiven Proben (29) stammte von Tauben und war dem Taubentyp zuzuordnen. Zwei APMV-Isolate von Stockenten (*Anas platyrhynchos*) wurden als Serotyp 4 charakterisiert. Von ausländischen Einrichtungen kamen zehn APMV-1 Isolate zur Untersuchung. Diese stammten von Tauben (6), Trappen (2), einem Greifvogel und einer Eule.

	Anzahl
Einsendungen	73
Nachweis von APMV-1	48
Nachweis anderer APMV-Serotypen	2
Abgabe von Referenzmaterialien	9
Ringtests	1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR NIPAH- UND HENDRA-VIRUS

Balkema-Buschmann, A., Eiden, M. Rodriguez, A.V., Groschup, M. H.

Infektionen mit dem Hendra-Virus und dem Nipah-Virus wurden in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts erstmals als Ursachen für respiratorische und neurologische Erkrankungen identifiziert, die bei einer Reihe von Tierspezies auftraten. Das Hendra-Virus verursachte 1994 erstmals schwere Atemwegserkrankungen bei Pferden, in dessen Verlauf zunächst vierzehn Pferde und der Trainer dieser Pferde in Brisbane, Australien, starben. Insgesamt wurden bisher sieben Menschen durch Kontakt zu infizierten Pferden infiziert (Trainer und Tierärzte), wovon vier Infektionen tödlich verliefen.

Zwischen September 1998 und April 1999 verbreitete sich das Nipah Virus unerkannt als Auslöser einer respiratorischen und enzephalitischen Infektion bei Schweinen in Malaysia und manifestierte sich dann als fatale Enzephalitis bei Menschen. Mehr als eine Million Schweine wurden im Rahmen der nun folgenden Bekämpfungsmaßnahmen getötet. Mehr als 400 Fälle von Nipah-Virus-Infektionen beim Menschen sind bisher bekannt geworden, von denen etwa 200 Menschen in Malaysia, Singapur, Bangladesch und Indien verstorben sind. Flughunde (Fruchtfledermäuse) der Gattung *Pteroptus* sind die natürlichen Wirte beider Viren. Um mögliche Einsendungen von Proben von Exporttieren oder infektionsverdächtigen Tieren bearbeiten zu können, wurde am Nationalen Referenzlabor ein *real-time* RT-PCR-Protokoll (Wang *et al.*, 2001) etabliert, welches dem

Nachweis des N-Gens dient. Des Weiteren wurde eine Kooperation mit dem australischen Referenzlabor für Hendra-Erkrankungen initiiert. In diesem Rahmen wurde dem deutschen Referenzlabor ein ELISA-Testverfahren zur Verfügung gestellt, um den diagnostischen Nachweis von Antikörpern gegen das Hendra-Virus bei für den Export in bestimmte Regionen bestimmten Pferden oder bei infektionsverdächtigen Pferden erbringen zu können.

Diagnostische Einsendungen wurden im Jahr 2009 nicht bearbeitet, da die etablierten Methoden bisher nicht anhand eines repräsentativen Sets an Pferde- oder Schweine-Seren validiert werden konnten. Das Nationale Referenzlabor wurde im Jahr 2009 in zwei Fällen kontaktiert, in dem bei für den Export nach Thailand bestimmten Rennpferden das Vorhandensein von Hendravirus-spezifischen Antikörpern ausgeschlossen werden sollte. Nach Diskussion mit den zuständigen Behörden in Deutschland und Thailand wurde auf die Untersuchung verzichtet, da eine Infektion mit dem Hendra-Virus in der Europäischen Union bisher nicht vorgekommen ist und die Seren zur Untersuchung an das australische Referenzlabor geschickt werden müssten. Sobald die diagnostischen Methoden hinreichend validiert sind, werden solche Untersuchungen am FLI durchgeführt werden können.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR PARATUBERKULOSE

Köhler, H., Möbius, P.

Die Diagnostik der Paratuberkulose erfolgt durch den kulturellen Erregernachweis in Kot- oder Organproben, durch Genomnachweis mittels PCR oder indirekt durch den Nachweis spezifischer Antikörper in Blutserum oder Milch. Die Aufgaben des Referenzlabors bestehen vor allem in der Sicherung der Qualität der verfügbaren diagnostischen Verfahren durch Ringversuche und die Prüfung der Methoden im Rahmen des amtlichen Zulassungsverfahrens und der Chargenfreigabe sowie in der Evaluierung und Implementierung neuer diagnostischer Methoden. Abklärungsuntersuchungen sind nur von untergeordneter Bedeutung.

Ende des Jahres 2009 waren in Deutschland drei kommerzielle ELISA-Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* zugelassen (Paratub. S und Paratub. B des Institut Pourquier, ID Screen Paratuberculosis Indirect der Firma ID Vet, CATTLETYPE MAP Ab der Firma Labor Diagnostik Leipzig), die Zulassung eines vierten Tests steht kurz vor dem Abschluss.

	Anzahl
Einsendungen Referenzproben: Mykobakterien-Isolate	47
Erregernachweise: Kot- und Organproben	93
Antikörpernachweise	1
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen	2/5
Abgabe von Referenzmaterialien	1
Ringtests: Erregernachweis von MAP in Kotproben von Rindern	1

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR PSITTAKOSE

Sachse, K., Schubert, E.

Eine Infektion mit dem Bakterium *Chlamydomphila (C.) psittaci*, dem Erreger der Psittakose, kann bei Vögeln akut, protrahiert, chronisch oder subklinisch verlaufen. Es zeigen sich respiratorische Symptome und/oder Zeichen von Konjunktivitis, Schnupfen, Husten oder Dyspnoe. Latent infizierte Tiere können den Erreger intermittierend über Jahre ausscheiden ohne dabei selbst zu erkranken. Die Ansteckung des Menschen durch *C. psittaci* erfolgt hauptsächlich aerogen über Staub- und Tröpfcheninfektion, aber auch durch Kontakt zu infizierten Tieren.

Der Erregernachweis über die Anzüchtung wird nur noch von spezialisierten Laboratorien durchgeführt. Kommerzielle Antigen-ELISA-Tests für *C. psittaci* sind gegenwärtig nicht verfügbar. Es werden validierte rtPCR-Tests eingesetzt, die bezüglich Spezifität der kulturellen Anzüchtung ebenbürtig und meist sensitiver sind.

Bei den am NRL bearbeiteten Psittakoseverdachtsproben handelt es sich überwiegend um Einsendungen der Untersuchungsämter zur Abklärung.

	Anzahl
Einsendungen Referenzproben: Psittakoseverdacht	77
Erregernachweise (pos.): <i>Chlamydomphila psittaci</i>	19
Einsendungen diagnostische Proben: <i>Chlamydiaceae</i>	5.661
Antikörpernachweise	3.550
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen	1/2
Abgabe von Referenzmaterialien: DNA	46
Abgabe von Referenzmaterialien: Stammkulturen	6
Ringtests	0

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR Q-FIEBER (*COXIELLA BURNETII*)

Henning, K.

Unter der Bezeichnung Q-Fieber (Coxiellose) werden Infektionen mit dem Bakterium *Coxiella burnetii* verstanden. Das Q-Fieber zählt zu den meldepflichtigen Tierseuchen. Die Krankheitserscheinungen beim Tier sind meistens gering. Seine Hauptbedeutung hat der Erreger als Auslöser von Unfruchtbarkeit und Aborten beim Wiederkäuer. Q-Fieber zählt außerdem zu den Zoonosen. Als labordiagnostischer Nachweis gilt ein positiver Befund mit mindestens einer der beiden folgenden Methoden: gefärbtes Ausstrichpräparat, Erregerisolierung (z. B. über Zellkultur) oder PCR (direkter Erregernachweis). Der indirekte (serologische) Nachweis erfolgt mittels KBR oder ELISA. Der serologische Nachweis für sich allein ergibt nicht den geforderten labordiagnostischen Nachweis einer bestehenden Q-Fieber-Infektion.

	Anzahl
Einsendungen Referenzproben insgesamt	1.956
- davon auf Erregernachweis (PCR, Anzucht)	1.405
- davon auf Antikörpernachweise (ELISA)	551
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen	2
Teilnahme an Ringtests	1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR RAUSCHBRAND

Seyboldt, C.

Der Rauschbrand ist eine seuchenhaft und akut verlaufende, infektiöse, aber nicht kontagiöse Gasödemkrankheit, die meist junge Rinder sowie gelegentlich Schafe bzw. Ziegen befällt. Infektionen mit diesem Erreger (*Clostridium (C.) chauvoei*) sind anzeigepflichtig. *C. chauvoei* muss von anderen Gasödemern, insbesondere von *C. septicum*, dem Erreger des Pararauschbrandes, abgegrenzt werden. Weitere Clostridienspezies sind differentialdiagnostisch zu berücksichtigen. Die Abgrenzung von *C. chauvoei* und *C. septicum* mit traditionellen mikrobiologischen Methoden ist problematisch, da sich die beiden Erreger in vielen Eigenschaften gleichen. Eine Differenzierung von Isolaten kann durch die Prüfung von biochemischen Eigenschaften („bunte Reihe“) unter anaeroben Bedingungen erfolgen. Weitere Möglichkeiten zur Identifikation von *C. chauvoei* sind die direkte Immunfluoreszenz sowie der Nachweis durch PCR-Methoden.

Spezifizierung	Anzahl
Einsendungen zur Rauschbranddiagnostik	13
Erregernachweise	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR RIFTTALFIEBER-VIRUS

Balkema-Buschmann, A., Jäckel, S., Eiden, M., Rodriguez, A.V., Groschup, M.H.

Das Rifttalfeber-Virus (engl. Rift Valley Fever Virus) gehört zur Familie der Bunyaviren, Genus *Phlebovirus*, und tritt nur in einem Serotyp auf. Der Erreger, welcher bis jetzt nur in Afrika sowie auf der arabischen Halbinsel nachgewiesen worden ist, wird durch Stechmücken v. a. der Gattungen *Aedes* und *Culex* übertragen und verursacht perakute oder akute zoonotische Erkrankungen. Unter bestimmten klimatischen Bedingungen wird die Vermehrung der Vektoren begünstigt, was ein gehäuftes Auftreten von Infektionen mit dem Rifttalfeber-Virus zur Folge hat. Kennzeichnend für die Erkrankung sind hämorrhagisches Fieber sowie eine hochgradige Leberschädigung. Besonders empfänglich sind Hauswiederkäuer (Schaf, Ziege, Rind), eine Erkrankung dieser Spezies führt zu hohen Abortraten und einer hohen Mortalität bei Neugeborenen. Resistenter gegenüber einer Infektion mit dem Erreger sind ältere, nicht-tragende Tiere. Nicht in Afrika beheimatete Rassen oder Stämme bzw. solche, die aus nicht-endemischen Gebieten stammen, scheinen eine höhere Empfänglichkeit aufzuweisen. Die Abortraten bei Kamelen sind vergleichbar mit denen beim Rind, jedoch erkranken Kamele meist klinisch inapparent. Eine Infektion des Menschen mit dem Rifttalfeber-Virus erfolgt durch Kontakt mit infiziertem Material oder durch Insektenstiche. Die Übertragung des Virus auf diesem Wege kommt vor allem in Gebieten mit einer geringen Wiederkäuerbestandsdichte vor. Dort kann die Erkrankung zuerst beim Menschen auffällig werden. Bei Laborpersonal ist es bereits zu schweren Erkrankungen mit Fieber, Hepatitis und Hirnhautentzündung gekommen, weshalb eine Impfung der Labormitarbeiter dringend anzuraten ist. Im nationalen Referenzlabor für Rifttalfeber-Virus wurden im Jahr 2009 diagnostische Methoden etabliert, sodass im Bedarfsfall eine Abklärung von Verdachtsproben geleistet werden kann. Zu diesen Methoden gehört zunächst die *real-time* RT-PCR zum Nukleinsäure-Nachweis. Dazu wurden die publizierten *real-time* RT-PCR-Protokolle zur Detektion des M-Segments (Drosten *et al.*, 2002) bzw. des S-Segments (Bird *et al.*, 2007) etabliert und an einigen zur Verfügung stehenden Kontrollseren validiert. Parallel hierzu wurden auch verschiedene kommerziell angebotene ELISA-Testverfahren erworben. Diese dienen dem Nachweis von IgM- oder IgG-Antikörpern bzw. dem

Antigen-Nachweis in Seren infektiöser verdächtigter Tiere. Die Etablierung und Validierung dieser Methoden wird in Kürze erfolgen. Im Sinne einer fundierten Absicherung der hier etablierten Nachweismethoden wurden Kooperationen mit verschiedenen Instituten in Afrika (Tansania, Senegal, Südafrika, Äthiopien) initiiert, die auch die Zusammenarbeit in wissenschaftlichen Projekten einschließen wird. Im Jahr 2009 wurden im Nationalen Referenzlabor für Rifttalfeber-Virus keine diagnostischen Einsendungen bearbeitet.

OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR UND FÜR ROTZ

Elschner, M., Neubauer, H.

Rotz ist eine durch das Bakterium *Burkholderia mallei* verursachte, akut, chronisch oder latent verlaufende anzeigepflichtige Infektionskrankheit der Einhufer mit zoonotischem Potential. Die Erkrankung tritt in Teilen Asiens und Südamerikas endemisch auf, dagegen gilt sie in Westeuropa als getilgt. Deutschland ist seit 1956 frei von dieser Tierseuche. Für Infektionen sind besonders Esel und Maultiere empfänglich. *B. mallei* wird von infizierten Tieren mit allen Körpersekreten ausgeschieden. Die Übertragung erfolgt ausschließlich horizontal durch direkten oder indirekten Kontakt mit infizierten Tieren oder kontaminierten Gegenständen. Klinische Verlaufsformen sind Hautrotz, Nasenrotz und Lungenrotz. Auf der Basis der Entscheidung 93/197/EWG der Kommission über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen und die Beurkundung für die Einfuhr von registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden sind für Equiden aus bestimmten Drittländern serologische Untersuchungen mittels KBR gefordert. Die Aufgabe des Referenzlabors umfasst insbesondere die Unterstützung der Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durch Abklärungsuntersuchungen bei positiven KBR-Befunden und die Zulassung bzw. Chargenprüfung von Diagnostika. Im Rahmen der OIE-Referenzlabortätigkeit werden Abklärungsuntersuchungen bei positiven KBR-Befunden sowie Trainingskurse zur Rotzdiagnostik durchgeführt.

	Anzahl
Einsendungen (Proben national und international)	3.080
Chargenprüfungen	1
Abgabe von Referenzmaterialien	144
Teilnahme an internationalen Ringversuchen	3
Tupfer-/Organproben (Monitoring/ Versuchstierkontrolle) auf Pneumonierreger	256

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR SALMONELLOSE DER RINDER

Methner, U.

Die Salmonellose der Rinder ist, in Abhängigkeit vom verursachenden *Salmonella*-Serovar, eine perakut bis chronisch oder symptomlos verlaufende Erkrankung, die meist bei Kälbern und bei Kühen um den Zeitpunkt des Abkalbens auftritt. Sie ist durch das Auftreten von Durchfällen mit Todesfällen, Bronchopneumonien, Arthritiden und Aborten ab dem 7. Trächtigkeitsmonat gekennzeichnet. Die Serovaren *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Dublin verursachen 70%-80% der angezeigten Rinder-Salmonellose-Ausbrüche in Deutschland. *Salmonella* Abortus-bovis, *Salmonella* Enteritidis sowie weitere, häufig wechselnde Serovaren sind für ca. 20%-30% der Ausbrüche verantwortlich. Die Tiergesundheitsjahresberichte des FLI geben einen Überblick über die epidemiologische Situation der Salmonellose der Rinder in Deutschland.

	Spezifizierung	Anzahl
Anzahl Einsendungen Referenzproben		109
Anzahl Erregernachweise		754
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen		2/24
Abgabe von Referenzmaterialien		10
Ringtests	Teilnahme	2
Beratungsleistungen		18

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR TOXOPLASMOSE

Schares, G.

Die Toxoplasmose ist eine durch den sich obligat intrazellulär vermehrenden einzelligen Parasiten *Toxoplasma gondii* hervorgerufene Infektionserkrankung. Sie zählt zu den meldepflichtigen Tierseuchen.

Feliden sind Endwirte von *T. gondii*; diese können im Kot umweltresistente Dauerstadien (Oozysten) ausscheiden. In Zwischenwirten persistiert *T. gondii* lebenslang und bildet dabei Gewebezysten aus. Infektionen werden vor allem verursacht durch den Verzehr von rohem oder nicht ausreichend erhitztem Fleisch infizierter Zwischenwirte, das lebende Stadien von *T. gondii* enthält, oder durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln oder Wasser, kontaminiert mit Oozysten aus dem Kot infizierter Feliden.

Bei vielen Tierarten verlaufen die meisten Infektionen mit *T. gondii* symptomlos. Bei Schafen und Ziegen kann die Infektion mit *T. gondii* zu Aborten führen. Bei bestimmten Tierarten, die hierzulande in Zoos gehalten werden, aber auch bei bestimmten einheimischen Wildtieren kann es zu schweren Infektionsverläufen kommen, die mit dem Tod der Tiere enden. Die meisten Primärinfektionen beim Menschen sind asymptomatisch; manche Patienten erkranken an einer Lymphadenopathie oder einer okulären Toxoplasmose. Eine primäre, während der Schwangerschaft erworbene Infektion kann den Föten schwer schädigen. Bei immunsupprimierten Patienten kann eine Reaktivierung latenter Infektionen zu lebensbedrohlichen Enzephalitiden führen.

Labor diagnostisch lassen sich Infektionen direkt mikroskopisch bei der histologischen oder bei der koproskopischen Untersuchung oder durch Erregerisolierung nachweisen. Bei diesen Verfahren ist eine anschließende Bestätigung der Erregeridentität mittels PCR erforderlich. Über spezifische Antikörper gegen Tachyzoitenstadien von *T. gondii* (z. B. im Immunfluoreszenztest, im ELISA, im Westernblot oder im Agglutinationstest) können Infektionen indirekt nachgewiesen werden.

	Anzahl
Einsendungen	82
Erregernachweise	32
Abgabe von Referenzmaterialien	2

WHO COLLABORATING CENTRE FOR RABIES SURVEILLANCE AND RESEARCH; OIE- UND NATIONALES REFERENZLABOR FÜR TOLLWUT

Müller, T., Freuling, C.

Die Erreger der Tollwut sind Einzelstrang-RNA-Viren negativer Polarität, die zum Genus *Lyssavirus* der Familie der *Rhabdoviridae* gehören. Drei der bislang sieben bekannten Genotypen (GT) kommen in Europa vor. Dazu gehören die Genotypen 1 (*Rabies Virus*, RABV), 5 und 6 [European bat lyssavirus 1 & 2 (EBLV-1 & 2)], für die Karnivoren bzw. Fledermäuse als Hauptreservoir fungieren. Seit 2008 gilt Deutschland wie viele andere west- und mitteleuropäische Länder bereits auch offiziell als tollwutfrei (Freiheit von klassischer Tollwut, RABV).

Die Aufgaben des nationalen und OIE-Referenzlabors für Tollwut leiten sich aus der Tollwut-Verordnung (TW-VO) vom 11. April 2001 (BGBl. I 2001 S. 598) in Verbindung

mit der Entscheidung BMELV vom 08. Juli 1997 sowie den Entscheidungen des OIE (1992) ab. Die Aufgaben als WHO CC wurden mit der Bestätigung der Redesignierung durch die WHO vom 16. Juli 2008 definiert.

	Spezifizierung	Anzahl
Anzahl Einsendungen Referenzproben		451
Anzahl Erregernachweise		41
Anzahl Antikörpernachweise	RFFIT/FAVN (OIE-Empfehlung)	362
Zulassungsuntersuchungen/Chargenprüfungen		4
Abgabe von Referenzmaterialien		2
Ringtests		2

NATIONALES VETERINÄR-MEDIZINISCHES REFERENZLABOR FÜR TUBERKULOSE

Moser, I., Köhler, H.

Die Tuberkulose ist eine chronisch verlaufende Infektionskrankheit bei Mensch und Tier (Zoonose), die durch granulomatöse Veränderungen der betroffenen Organe

charakterisiert ist und oft tödlich endet. Sie zählt zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Deutschland ist seit vielen Jahren amtlich frei von Tuberkulose, dennoch wurden im Jahr 2009 23 Ausbrüche diagnostiziert. Die Erreger der Tuberkulose bei Mensch und Tier werden im *Mycobacterium (M.) tuberculosis*-Komplex (MTC) zusammengefasst. Nicht zum MTC gehörende Mykobakterien (*M. avium* und andere atypische Mykobakterien) sind meist weniger pathogen für Mensch und Tier (Ausnahme: jeweilige Primärwirte). Bei der Diagnostik gilt noch immer die Kultivierung als sicherste und sensitivste Nachweismethode („Goldstandard“). Um die relativ lange Zeit bis zur Diagnosestellung abzukürzen, kann die mykobakterielle DNA mittels PCR direkt in Organextrakten nachgewiesen werden. Seit 2009 wird dabei ein am FLI entwickeltes *real-time* PCR-System verwendet, das auch an die Landesuntersuchungsämter übergeben wurde. Der PCR-Befund wird durch Anzucht des Erregers bestätigt. Zur weiteren Typisierung werden verschiedene molekularbiologische Methoden (Spoligotyping, VNTR-Typing, DNA-Sequenzanalyse) angewandt. Der Nachweis und die Typisierung von Mykobakterien in eingesandten Verdachtsproben (Bestätigung, Abklärung), molekularepidemiologische Untersuchungen sowie immunologische Nachweisverfahren (Gamma-Interferon-Test) machen einen wesentlichen Teil der Arbeit des Referenzlabors aus. Daneben gewinnt die Mitarbeit an internationalen Kooperationsprojekten (Afrika) an Bedeutung.

Einsendungen	Anzahl	Erregernachweise in Proben		
		MTC	<i>M. avium</i>	andere
Rind	61 Proben von 41 Tieren	28		
Schwein	91 Proben von 68 Tieren	1	71	1
Geflügel/Vögel	29 Proben von 18 Tieren		17	
Wild	21 Proben von 13 Tieren	5		
Pferd, Katze, Hund	9 Proben von 6 Tieren		3	
Schaf	1 Probe von 1 Tier	1		
Zootiere	48 Proben von 14 Tieren	3	15	
Wechselwarme	7 Proben von 5 Tieren			4
Gesamt	267 Proben von 166 Tieren	38	106	8
Nachweise von Gamma-Interferon	59 Tiere	2		
Abgabe von Referenzmaterialien	14			
Ringtests national	2			

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR SCRAPIE

Hoffmann, C., Balkema-Buschmann, A., Eiden, M., Groschup, M.H.

Im Jahr 2009 wurden insgesamt zwölf Scrapie-Ausbrüche bei Schafen diagnostiziert. Dabei handelte es sich ausschließlich um Einzelfälle atypischer Scrapie bei Schafen. Seit Einführung der aktiven amtlichen TSE-Untersuchungen für kleine Wiederkäuer im Jahre 2002 wurden damit insgesamt 297 Scrapie-Fälle bei Schafen und kein Fall bei einer Ziege festgestellt. Im Jahre 2009 wurden gemäß Verordnung (EG) Nr. 727/2007 in Deutschland jeweils 10.000 geschlachtete und 10.000 verendete Tiere mit Hilfe eines zur TSE-Überwachung bei kleinen Wiederkäuern zugelassenen Schnelltests untersucht. Das NRL begleitete diese Schnelltest-Untersuchungen durch die fachliche Beratung der insgesamt 18 staatlichen und privaten Schnelltestslabors, durch gutachterliche Stellungnahmen im Rahmen der nationalen und internationalen Zulassung der TSE-Schnelltests und durch praktische Untersuchungen im Rahmen der Chargen-Prüfungen dieser Tests. Ferner wurde die Performance der Anwender durch die Durchführung eines Ringversuches getestet.

In Schnelltests verdächtige Proben wurden mittels der vom OIE anerkannten Bestätigungstests abgeklärt. Weiterhin wurden gemäß EU-Verordnung 214/2005 alle im Jahr 2009 diagnostizierten TSE-Fälle bei Schafen mittels des FLI-Tests, einem vom EU-Referenzlabor zugelassenen, am FLI entwickelten Diskriminierungstest, untersucht, um eine mögliche BSE-Infektion bei kleinen Wiederkäuern aufzudecken. Alle TSE-Fälle waren demnach atypische Scrapie-Fälle. Dieses Ergebnis wurde den Einsendern unverzüglich mitgeteilt, da es erheblichen Einfluss auf die Bekämpfungsstrategie hat. Auf Grundlage der Erkenntnisse zur genetischen Scrapieresistenz und ihrer Bedeutung bei der Verhütung, Kontrolle und Tilgung der Scrapie wurde der Genotyp sämtlicher TSE-Fälle in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik an der Justus-Liebig-Universität in Gießen bestimmt und den zuständigen Länderbehörden mitgeteilt. Das NRL stand in engem wissenschaftlichem Kontakt mit den NRLs der anderen EU-Mitgliedstaaten und dem CRL am VLA Weybridge. Hierzu gehörten auch die Teilnahme am jährlichen Treffen aller NRLs wie auch die aktive Mitarbeit in der sog. Strain-Typing Expert Group (STEG) des CRL.

Kleine Wiederkäuer (nur Schafe)		Anzahl
Anzahl Einsendungen		15
Anzahl Erregernachweise	alle atypische Scrapie	12
Chargenprüfungen		3 *
Durchgeführte nationale Ringversuche		1
Teilnahme internationale Ringversuche		4

* hier gelistet sind nur die Chargenprüfungen für Tests, die zur Untersuchung von Proben kleiner Wiederkäuer zugelassen sind. Testverfahren zur Untersuchung von Rinderproben und Proben kleiner Wiederkäuer sind bei den BSE-Schnelltests aufgeführt.

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR DIE TRICHOMONADENSEUCHE DES RINDES

Henning, K.

Die Trichomonadenseuche des Rindes ist eine durch den einzelligen Parasiten *Trichomonas foetus* hervorgerufene Deckinfektion des Rindes. Sie zählt zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Der Erreger wird beim Deckakt übertragen. Im Anschluss an eine Infektion besiedeln die Trichomonaden beim Bullen die Präputialhöhle, den Penisgraben und die Mündung der Harnröhre. Infizierte Bullen zeigen oft nur leichte oder überhaupt keine Symptome. Bei Kühen werden Vagina und Uterus besiedelt. Die Infektion führt hier zu Vaginitis, Endometritis und Aborten. Als Komplikation können bakterielle Begleitinfektionen auftreten.

Als labordiagnostischer Nachweis gilt ein positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden: Mikroskopischer Nachweis (z. B. Dunkelfeld-Mikroskop, gefärbtes Ausstrichpräparat), Anzucht des Erregers oder Nachweis mittels PCR. Problematisch ist die Verwechslungsmöglichkeit von *T. foetus* mit anderen Trichomonaden. Hierbei spielen insbesondere Kontaminationen mit Flagellaten aus dem Darmtrakt eine Rolle.

	Anzahl
Einsendungen auf <i>T. foetus</i> bei Katzen	23
Einsendungen auf <i>T. foetus</i> bei Hunden	1

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR TULARÄMIE

Tomaso, H.

Die Tularämie (Hasenpest) ist eine Infektionskrankheit hervorgerufen durch *Francisella (F.) tularensis*. Es handelt sich dabei um gramnegative, unbewegliche, aerob wachsende Bakterien. Sie bilden keine Sporen, sind aber dennoch gegenüber äußeren Bedingungen sehr widerstandsfähig. Betroffen sind in Deutschland vorwiegend Nagetiere, Hasen und Wildkaninchen, aber auch eine Vielzahl anderer Tiere einschl. Vögel mit unterschiedlicher Empfänglichkeit. Krankheit und Nachweis des Erregers der Tularämie sind bei Hasen und Kaninchen meldepflichtig (Neufassung der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 20. Dezember 2005).

Spezifizierung	Anzahl
Einsendungen Referenzproben	59
Erregernachweise (durchgeführte Tests)	127
Antikörpernachweis	4
Abgabe von Referenzmaterialien	27
Ringtests	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR VIBRIONENSEUCHE DER RINDER

Müller, W.

Campylobacter (C.) fetus subsp. *venerealis* ist der Erreger der bovinen genitalen Campylobacteriose (bgC), früher, aber auch noch in der Neufassung der Rinder-Deckinfektionen-Verordnung vom 20. Dezember 2005 als Vibriose der Rinder bezeichnet. Diese venerische Infektionskrankheit der Rinder ist eine anzeigepflichtige Tierseuche und durch Infertilität, frühe embryonale Mortalität und Abort charakterisiert. Das verursachende Bakterium besitzt einen ausgeprägten Tropismus für die Genitalschleimhaut des Rindes (enzootischer Abort). Ein eng verwandter Mikroorganismus ist die zweite Subspezies von *C. fetus*. Dieser Keim, *C. fetus* subsp. *fetus*, hat sein natürliches Erregerreservoir im Intestinaltrakt des Rindes, doch ist auch er in der Lage, Aborte zu verursachen (sporadischer Abort). Die unterschiedliche klinische Bedeutung der beiden Subspezies erfordert deren exakte Identifizierung.

Am 16. Juni 2009 fand ein Workshop zur „Diagnostik und Bekämpfung der „bovinen genitalen Campylobacteriose“ in Erlangen statt. Teilnehmer waren die Untersuchungssämter,

Praktiker aus Besamungsstationen, das Konsiliarlabor und das nationale Referenzlabor am FLI. Es wurden Möglichkeiten zur verbesserten Diagnostik aufgezeigt, die in die Methodensammlung des FLI eingearbeitet werden. Auch die Bekämpfung mit der Möglichkeit einer Vakzinierung mit stallspezifischer Vakzine hat sich bewährt.

Spezifizierung	Anzahl
Einsendungen Referenzproben	15
Erregernachweise	7
Abgabe von Referenzmaterial	2

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR WEST-NILE-VIRUS

Groschup, M.H., Ziegler, U.

West-Nile-Virus (WNV) ist ein „arthropod-borne“ (Arbo-) Virus innerhalb der Gattung *Flavivirus* in der Familie der *Flaviviridae*. Es gehört zur Gruppe der Japan-Enzephalitis-Viren, wird durch Moskitos übertragen und besitzt ein hohes zoonotisches Potential. Infizierte Wildvögel fungieren als Virusreservoir. Durch veränderte Klimabedingungen und die bereits vorhandenen Hauptvektoren des WNV (*Culex pipiens*-Stechmücken) im Süden Deutschlands ist nicht auszuschließen, dass sich dieser Erreger nach einem Eintrag halten und verbreiten kann. Gleichzeitig zeigt der Ausbruch von WNV bei Wildvögeln in Österreich im Herbst 2008 und bei Pferden in Italien 2008 und 2009, dass sich das Virus immer weiter nordwärts ausbreitet. Auch im Jahr 2009 wurde das aktive Überwachungsprogramm an Hunderten von Proben von Vögeln und Pferden am FLI weitergeführt. Im Ergebnis dieser Studie konnten WNV-spezifische Antikörper bei mittel- bis langstreckenziehenden Zugvögeln nachgewiesen werden. Bei Standvögeln, Wirtschaftsgeflügel in Freilandhaltung oder bei Pferden gab es keine Antikörperfunde. Ebenso wenig wurden WNV-spezifische Nukleinsäuren in den untersuchten Proben nachgewiesen. Seit Mai 2009 ist ein konventioneller Tot-Impfstoff (Innovator® Fort Dodge) für den Einsatz bei Pferden in Deutschland zugelassen. Am NRL wurden deshalb erste Verlaufsstudien zur Antikörperbildung nach Vakzination bei Pferden mittels Serum-Neutralisationstest durchgeführt. Zur Verbesserung der Diagnostik, vor allem zum Einsatz als Screening-Verfahren und zur Anwendung bei sehr geringen Probenvolumina (insbesondere von Wildvögeln) wurde ein indirekter ELISA auf der Basis von rekombinantem Protein entwickelt. Gleichzeitig befinden sich derzeit zwei ELISA-Verfahren für WNV-Antikörper in der nationalen Zulassung.

	Spezifizierung	Anzahl
Einsendungen		23
Erregernachweise	<i>real-time</i> RT-PCR	0
Antikörpernachweise	Immunfluoreszenztest in-house ELISA Neutralisationstest	0 0 0
Verlaufsstudien zur Antikörperbildung nach Vakzination bei Pferden	Neutralisationstest	42
Zulassungsuntersuchungen/ Chargenprüfungen		0
Monitoringproben	Pferde, Freilandgeflügel, Wildvögel	ca. 1.000

NATIONALES REFERENZLABOR FÜR DURCH ZECKEN ÜBERTRAGENE KRANKHEITEN

Süss, J., Klaus, C.

Das Nationale Referenzlabor für durch Zecken übertragene Krankheiten (NRL-ZüK) befasst sich sowohl mit der Biologie und Populationsdynamik der Zecke als Vektor als auch mit den durch Zecken übertragenen Krankheiten, wobei Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und Lyme Borreliose (LB) als in Deutschland wichtigste virale bzw. bakterielle durch Zecken übertragene Krankheiten bei Mensch und Tier im Vordergrund stehen. Weitere durch Zecken übertragene Erkrankungen sind z. B. Babesiose, Anaplasmosen und weitere Rickettsiosen, deren Bedeutung gegenwärtig immer noch als gering eingeschätzt wird. FSME kann neben den bekannten humanmedizinischen Erkrankungen mit ähnlichem klinischem Bild auch bei Hunden, Pferden und Affen auftreten. Schafe, Ziegen und Rinder können das Virus nach Zeckenstichexposition auch über die Milch ausscheiden, ohne dabei selbst klinisch zu erkranken. Der Genuss dieser Milch unpasteurisiert kann beim Menschen die sog. alimentäre FSME hervorrufen, die klinisch nicht von einer Erkrankung nach Zeckenstichexposition zu unterscheiden ist.

Erkrankungen durch *Borrelia burgdorferi* s.l. als Erreger der LB treten beim Menschen sehr häufig auf, bei Pferden, Rindern und Hunden ebenso. Die Bedeutung der LB bei Schafen, Ziegen und Katzen ist bisher unklar. Vögel können als Reservoirwirte für *Borrelia burgdorferi* dienen, klinische Erkrankungen wurden bisher nicht nachgewiesen.

Die Aufgaben des NRL-ZüK umfassen Beratungen und Vorträge zu FSME, Borreliose und andere durch Zecken übertragene Krankheiten einschließlich Zeckenstichprophylaxe, FSME-Virusnachweise in Zecken (*real-time* RT-PCR) sowie in

Liquor- und Serumproben. Die Isolierung, Charakterisierung und komplette Sequenzierung von FSME Viren dient u. a. der Risikobewertung. Nachweise spezifischer FSMEV-Antikörper bei Haus- und Weidetieren, Unterstützung bei der Abklärung von Borrelioseverdachtsfällen durch Antikörpernachweis (ELISA, Westernblot). Komplexe Untersuchungen dienen der Charakterisierung von FSME-Naturherden und damit von Risikogebieten für Mensch und Tier.

Die laborseitige Bearbeitung und Bewertung von veterinärmedizinischen Diagnostika (Zulassungen, Chargenprüfungen) für durch Zecken übertragene Krankheiten ist eine wesentliche Referenzaufgabe.

	Anzahl
Erregernachweise	380
Antikörpernachweise	2.807
Chargenprüfungen	10
Abgabe von Referenzmaterialien	5
Beratungsleistungen	150

NATIONALE REFERENZLABORE FÜR EXOTISCHE ZONNOSEN IM AUFBAU

Das FLI fungiert als NRL für Filoviren (Marburg/Ebola) und für Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus bei Tieren. Derzeit stehen für Arbeiten mit diesen BSL4-Erregern noch keine Labormöglichkeiten zur Verfügung. Dies wird im Neubau des FLI gewährleistet sein. In der Zwischenzeit wurden im INNT qRT-PCR-Nachweise für diese Erreger(genome) etabliert und eine wissenschaftliche Zusammenarbeit mit dem OIE-Referenzlabor (M. Bouloy, Pasteur-Institut, Paris), mit dem Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg) und mit Janusz Paweska (NICD Sandringham, Südafrika) begonnen, so dass entsprechende diagnostische Nachfragen im Rahmen dieser Kooperationen abgeklärt werden können.

3 RECHTLICHE GRUNDLAGEN DER TIERSEUCHEN-BEKÄMPFUNG

Das Tierseuchengesetz (TierSG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004 (Bundesgesetzblatt I Seite 1260) ist in der Bundesrepublik Deutschland die Grundlage für die staatliche Bekämpfung von Tierseuchen. Das Tierseuchengesetz enthält Vorschriften für die Ein-, Durch- und Ausfuhr von Tieren, tierischen Erzeugnissen und Rohstoffen und dient insoweit der Abwehr der Einschleppung von Tierseuchen aus dem Ausland. Außerdem enthält es Vorschriften für die Bekämpfung der Tierseuchen im Inland. Die Maßnahmen zur Abwehr der Einschleppung von Tierseuchen aus dem Ausland und zur Vorbeuge und Tilgung der Tierseuchen im Inland ergänzen sich gegenseitig.

Auf europäischer Ebene regelt das **EU-Recht zur Tiergesundheit** die Bekämpfungsmaßnahmen zu den wichtigsten Tierseuchen und die entsprechenden Tilgungs- und Überwachungsprogramme. Die Durchführung der gesetzlich vorgesehenen Maßnahmen liegt in der Verantwortung der Mitgliedstaaten.

Die wichtigsten Richtlinien der EU zur Tiergesundheit sind:

- RL 2003/99/EG zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates, zuletzt geändert durch RL 2006/104/EG

- RL 2006/88/EG mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten
- RL 82/894/EWG über die Mitteilung von Viehseuchen in der Gemeinschaft, zuletzt geändert durch die Entscheidung 2008/650/EG
- RL 92/119/EWG mit allgemeinen Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung bestimmter Tierseuchen sowie besonderen Maßnahmen bezüglich der vesikulären Schweinekrankheit, zuletzt geändert durch RL 2008/73/EG

Auf internationaler Ebene sind durch die **Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE)** eine Reihe von „Notifiable Diseases“ festgelegt. Das OIE stellt umfangreiche Daten zur Tiergesundheitssituation in Ländern aus aller Welt sowie die ergriffenen Maßnahmen zur Tierseuchenbekämpfung zur Verfügung.

3.1 Anzeigepflichtige Tierseuchen

Die Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2004 (Bundesgesetzblatt I Seite 2764), zuletzt geändert durch Artikel 5 der Verordnung vom 18. Dezember 2009 (Bundesgesetzblatt I Seite 3939) legt die anzeigepflichtigen Tierseuchen in Deutschland fest. In der Tabelle aufgeführt sind die anzeigepflichtigen Tierseuchen, für die weitere nationale oder internationale Rechtsvorschriften bestehen und ein NRL am FLI eingerichtet ist.

Tierseuche	Rechtsgrundlage
Affenpocken	EG-Verordnung für Affenpocken: Nr:1398/2003)
Afrikanische Pferdepest	RL 82/894/EWG; RL 92/35/EWG des Rates vom 29. April 1992 zur Festlegung von Kontrollregeln und Maßnahmen zur Bekämpfung der Pferdepest; Leitlinien zur Pferdepestbekämpfung
Afrikanische Schweinepest	RL 82/894/EWG ; RL 92/119/EWG; RL 2002/60/EG, zuletzt geändert durch RL 2008/73/EG; SchwPestV vom 20.12.2005, zuletzt geändert am 06.04.2009; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Ansteckende Blutarmut der Einhufer	RL 82/894/EWG; VO-Ansteckende Blutarmut der Einhufer (BlutArmV) vom 02.07.1975, zuletzt geändert am 18.04.2000
Ansteckende Schweinelähmung (Teschener Krankheit)	RL 2002/60/EG, zuletzt geändert am 15.07.2008; VO über Sperrbezirke bei Ansteckender Schweinelähmung (SchwKrSpBezV) vom 24.07.1987, zuletzt geändert am 20.12.2005
Aujeszkysche Krankheit	EU Entsch. 93/24 in Verb. mit EU RL 64/432 und 93/244; VO zum Schutz gegen die Aujeszkysche Krankheit (AujeszkKrV) vom 20.12.2005

Tierseuche	Rechtsgrundlage
Beschälseuche der Pferde	RL 82/894/EWG
Blauzungenkrankheit	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG; EU-Verordnung für BTV: Nr. 1266/2007; VO zum Schutz gegen die Blauzungenkrankheit (BlauzungenV) vom 22.03.2002, zuletzt geändert am 06.04.2009
Bovine Herpesvirus Typ 1-Infektion (alle Formen)	EU RL 93/42 in Verb. mit EU RL 95/109; VO zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit BHV1 (BHV1V) vom 20.12.2005
Bovine Virus Diarrhoe	VO zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit BVDV (BVDV) vom 11.12.2008
Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen	RL 2003/99/EG; Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG geändert durch Verordnung (EG) Nr. 535/2002 vom 21. März 2002; VO zum Schutz gegen die Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen (BrucelloseV) vom 20.12.2005
Enzootische Leukose der Rinder	VO zum Schutz gegen die Leukose der Rinder (LeukoseV) vom 13.03.1997, zuletzt geändert am 20.12.2005
Epizootische Hämorrhagie der Hirsche	RL 92/119/EWG
Fischseuchen (Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden, Infektiöse Hämato-poetische Nekrose der Salmoniden, Ansteckende Blutarmut der Lachse, Koi Herpesvirus-Infektion der Karpfen, Epizootisches Ulzeratives Syndrom, Epizootische Hämato-poetische Nekrose)	RL 82/894/EWG; RL 2006/88/EG; Entscheidung der Kommission 2001/183/EG vom 22. Februar 2001 zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG; Fischseuchenverordnung (FischSeuchV) vom 24. November 2008
Aviäre Influenza	RL 82/894/EWG; EU RL 05/94 und EU Entscheidung 06/437 VO zum Schutz gegen die Geflügelpest (GeflPestSchV) vom 18.10.2007, zuletzt geändert am 06.04.2009
Krebstierkrankheiten (Taura-Syndrom; Weißpünktchenkrankheit; Yellowhead Disease)	RL 82/894/EWG; RL 2006/88/EG; Fischseuchenverordnung (FischSeuchV) vom 24. November 2008
Lumpy-skin-Krankheit (Dermatitis nodularis)	RL 92/119/EWG
Lungenseuche der Rinder	RL 82/894/EWG; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Maul- und Klauenseuche	RL 82/894/EWG; RL 2003/85/EG; VO zum Schutz gegen die Maul- und Klauenseuche (MKSeuchV) vom 20.12.2005; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Milzbrand	VO zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand (MilzbRbV) vom 23.05.1991

Tierseuche	Rechtsgrundlage
Muschelkrankheiten (Infektion mit <i>Bonamia exitiosa</i> , Infektion mit <i>Bonamia ostreae</i> , Infektion mit <i>Marteilia refringens</i> , Infektion mit <i>Microcytos mackini</i> , Infektion mit <i>Perkinsus marinus</i>)	RL 82/894/EWG; RL 2006/88/EG; Entscheidung der Kommission 2001/183/EG vom 22. Februar 2001 zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG; Fischseuchenverordnung (FischSeuchV) vom 24. November 2008
Newcastle-Krankheit	RL 82/894/EWG; EU RL 92/66; VO Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit (GeflPestV) vom 20.12.2005; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Pest der kleinen Wiederkäuer	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Pferdeenzephalomyelitis (alle Formen)	RL 82/894/EWG
Pockenseuche der Schafe und Ziegen	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Psittakose (Aviäre Chlamydiose)	RL 2003/99/EG; PsittakoseV vom 20.12.2005
Rauschbrand	VO zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand (MilzBRbV) vom 23.05.1991; in Verbindung mit der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen
Rifttal-Fieber	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Rinderpest	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Rotz (Malleus)	RL 82/894/EWG; Entscheidung 93/197/EWG der Kommission zur Einfuhr von Equiden; Richtlinien zur Feststellung von Rotz vom 07.05.1974, zuletzt geändert am 01.07.1979; VO über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (BmTierSSchV) vom 06.04.2005, zuletzt geändert 11.12.2006
Salmonellose der Rinder	RL 2003/99/EG; VO zum Schutz gegen die Salmonellose der Rinder (RindSalmV) vom 14.11.1991
Schweinepest (klassische)	RL 82/894/EWG; EU RL 2001/89; VO Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest (SchwPestV) vom 20.12.2005, zuletzt geändert am 06.04.2009; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Stomatitis vesicularis	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG
Tollwut	RL 2003/99/EG; EU-RL 92/65; VO zum Schutz gegen die Tollwut (TollwV) vom 11.04.2001, zuletzt geändert am 17.06.2009; OIE-gelistete Krankheit
Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (alle Formen)	RL 82/894/EWG; EU-VO 999/2001; TSEÜberwV vom 13.12.2001, zuletzt geändert am 21.07.2009; TSEVorsorgV vom 20.12.2005; TSEResZV vom 17.10.2005, zuletzt geändert am 31.10.2006; BSEUntersV vom 18.09.2002, zuletzt geändert am 11.12.2008; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Trichomonadenseuche der Rinder	VO zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder (RDeckInfV) vom 03.06.1975 in der Neufassung vom 20.12.2005

Tierseuche	Rechtsgrundlage
Tuberkulose der Rinder (<i>Mycobacterium bovis</i> und <i>M. caprae</i>)	RL 2003/99/EG; VO zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (RindTbV) vom 13.03.1997, zuletzt geändert am 17.06.2009; Zoonosenrichtlinie 92/117/EWG (ABl. EG Nr. L 62/93); Richtlinie BMELV über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen i.d.F.v. 11. November 2009
Vesikuläre Schweinekrankheit	RL 82/894/EWG; RL 92/119/EWG; Entsch. 2000/428/EG, Verordnung zum Schutz gegen die Vesikuläre Schweinekrankheit; VSchwKrSchV vom 11.04.2001, zuletzt geändert am 06.07.2007; Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen
Vibrionenseuche der Rinder	VO zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder (RDeckInfV) vom 03.06.1975 in der Neufassung vom 20.12.2005

3.2 Meldepflichtige Tierkrankheiten

Die Verordnung über die meldepflichtigen Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 20. Dezember 2005 (Bundesgesetzblatt I Seite 3516), geändert durch Artikel

2 der Verordnung vom 6. April 2009 (Bundesgesetzblatt I, Seite 752), regelt die Meldepflicht. In der Tabelle aufgeführt sind die meldepflichtigen Tierkrankheiten, für die weitere nationale oder internationale Rechtsvorschriften bestehen und ein NRL am FLI eingerichtet ist.

Tierkrankheiten	Rechtsgrundlage
Ansteckende Metritis des Pferdes (CEM)	Entscheidung 93/197/EWG vom 5.2.1993 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen und die Beurkundung für die Einfuhr von registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden
Campylobacteriose (thermophile <i>Campylobacter</i>)	RL 2003/99/EG
Echinokokkose	RL 2003/99/EG
Paratuberkulose	Paratuberkulose-Leitlinien vom 17.01.2005
Toxoplasmose	RL 2003/99/EG (je nach epidemiologischer Situation)

3.3 Weitere nationale Referenzlabore am FLI

Zusätzlich zu den NRLs für anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten sind am FLI auch nationale Referenzlabore für einige Tierkrankheiten etabliert, die nur nach Vorgaben der OIE meldepflichtig sind.

Das NRL für „durch Zecken übertragene Krankheiten“ (ZÜK) wurde aufgrund des Erlasses des Bundesministeriums für Gesundheit vom 19.11.1999 auf der Grundlage von Art. 3 in Verbindung mit Art. 4 der Richtlinie 92/117/EWG vom 17.12.1992 eingerichtet.

VI. ORGANISIERTE VERANSTALTUNGEN

Übersicht über Wissenschaftliche Tagungen und Kongresse, die vom FLI oder unter der Beteiligung von FLI-Angehörigen organisiert wurden.

Datum		Titel der Veranstaltung	Verantwortlicher Wissenschaftler
17.02.2009	Celle	DLG Geflügeltagung	Berk, J.
17. – 18.03.2009	Braunschweig	Optimierung des Futterwertes von Mais und Maisprodukten - Wissensstand und Perspektiven	Meyer, U.
18. – 19.03.2009	Leipzig	19th Annual Meeting of the Society for Virology, Workshop: Zoonoses and Epidemiology (ZE)	Ulrich, R.
19. – 21.03.2009	Weimar	X International Jena Symposium for Tick-borne Diseases	Süss, J.
19. – 20.03.2009	Mannheim	12. Workshop ‚Respiratorisches System‘	Reinhold, P.
21.4.2009	Mariensee	Vortragstagung der Gesellschaft der Förderer und Freunde für Geflügel- und Kleintierforschung e.V.	Schrader, L.
22. – 24.04.2009	Greifswald	3rd ESV Veterinary Herpesvirus Symposium	Mettenleiter, T.
23. – 24.04.2009	Braunschweig	Die Milchkuh im Spannungsfeld von Leistungshöhe, Ernährung und Gesundheit	Flachowsky, G.
13. – 14.05.2009	Celle	16. Internationale Tagung über Haltung und Krankheiten der Kaninchen, Pelztiere und Heimtiere	Hoy, S. Schrader, L.
13. – 14.05.2009	Jena	Arbeitstagung Mykobakterieninfektionen	AG Mykobakterien
14. – 15.05.2009	Jena	3. Treffen des Verbundes Zoonotische Chlamydien	Sachse, K.
14.05.2009	Antalya	Crossing Borders, 3rd Annual Meeting Epizone	Conraths, F.
26. – 28.05.2009	Greifswald	Climate Change and Infectious Diseases	Mettenleiter, T.
11.-13.06.2009	München / Mariensee	D-NOTES 2009 - Herausforderung: Interdisziplinarität und Interventionelle Endoskopie	Köhler, P.
12. -14.06.2009	Murcia	First European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Aspects	Sachse, K.
15.07.2009	Hannover	Jahrestagung des Virtuellen Zentrums für Reproduktionsmedizin	Rath, D.
02. – 04.09.2009	Gießen	Krankheitsdynamik in Populationen - Bedeutung von Surveillance- und Impfprogrammen, Tagung der FG Epidemiologie und Dokumentation der DVG	Conraths, F.
07. – 08.09.2009	Berlin	Nationales Symposium für Zoonosenforschung (Nationale Forschungsplattform für Zoonosen)	Groschup, M.
09.09.2009	Prag	13. International Conference of Fish and Shellfish Diseases organised by the EAFF	Bergmann, S.

Datum		Titel der Veranstaltung	Verantwortlicher Wissenschaftler
23.09.2009	Celle	3. Celler Fachgespräche	Schrader, L.
01.- 02.10.2009	Jena	26. Jenaer Symposium „Clostridien“	Seyboldt, C.
12. – 13.10.2009	Berlin	International Workshop „Common Cold – SARS – Pandemic Influenza: Novel strategies to fight respiratory viral diseases“ (Nationale Forschungsplattform für Zoonosen)	Planz, O.
04. – 06.11.2009	Greifswald	4. Riemser Diagnostiktage	Beer, M.
18. – 20.11.2009	Paris	5th EPIZONE meeting on “Intervention Strategies 2009”	Vahlenkamp, T.
in 2009	Mariensee	Vortragsveranstaltung „Marienseer Gespräche“ Kolloquiumsreihe mit eingeladenen Sprechern (10 Veranstaltungen)	Groeneveld, E. Großmann, R. Niemann, H. Rath, D. Schwarz, S.

Übersicht über Weiterbildungsveranstaltungen, die vom FLI oder unter der Beteiligung von FLI-Angehörigen organisiert wurden:

Datum		Titel der Veranstaltung	Verantwortlicher Wissenschaftler
09. – 13.02.2009	Mariensee	International Cryo-Workshop	Groeneveld, E.
11. – 15.05.2009 08. – 12.06.2009 16. – 27.11.2009	Jena	Workshop „Serological diagnosis of glanders“ im Rahmen der OIE- Referenzlabortätigkeit	Elschner, M. Melzer, F. Tomaso, H.
10. – 14.08.2009	Jena	Workshop „Diagnostic of brucellosis and <i>Brucella</i> spp.“ im Rahmen der OIE-Referenzlabortätigkeit	Melzer, F.
24. – 25.09.2009	Wusterhausen	Epidemiology of Emerging Diseases	Conraths, C.
19. – 30.10.2009	Jena	„Detection of <i>Brucella</i> sp., <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>F. tularensis</i> ssp. and <i>B. anthracis</i> “ im Rahmen des EU-Projektes EQADeBa	Elschner, M. Melzer, F. Tomaso, H.
16. – 19.11.2009	Mariensee	Perl-Lehrgang	Lichtenberg, H.

VII. PRESSE- UND ÖFFENTLICHKEITSARBEIT

Das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI), hat sich als Ansprechpartner der Medien für Fragen rund um die Tiergesundheit fest etabliert. Hierbei spielen nicht nur tagesaktuelle Themen eine Rolle, sondern auch Hintergrundinformationen zu den verschiedenen Forschungsbereichen des Instituts. Nachfolgend ein kleiner Überblick über die Medienthemen des vergangenen Jahres.

Die „Schweinegrippe“ dominierte die Medien im Jahr 2009. Hier galt es im Frühjahr zunächst klarzustellen, dass sich hinter dem irreführenden Namen keine Tierkrankheit verbirgt, die direkt vom Schwein auf den Menschen übertragen wird, sondern ein neues humanes Influenzavirus. Mit der Einstufung der weltweiten Epidemie des neuen Influenzavirus A/H1N1 als Pandemie verlagerten sich die Fragen stärker in Richtung Humanmedizin und somit an die „Schwesterinstitute“ des FLI, das Robert Koch-Institut und das Paul-Ehrlich-Institut. Dessen ungeachtet gab das FLI zahlreichen Redaktionen Auskunft über die Rolle des Schweins beim Geschehen und mögliche Auswirkungen auf die Schweinehaltung und stellte entsprechende Informationen auf seiner Internetseite zur Verfügung.

Einen weiteren Themenkomplex bildeten der Klimawandel und seine Auswirkungen auf die Verbreitung von Tierseuchenerregern, aber auch die Bedeutung der Nutztierhaltung für die Produktion von klimarelevanten Gasen wie Methan. Das FLI richtete dazu gemeinsam mit der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina (Deutsche Akademie der Wissenschaften) und der indischen Akademie der Wissenschaften im Mai die internationale Tagung „Climate change and infectious diseases“ in Greifswald aus. Vertreter aus Klimaforschung, Biologie sowie Human- und Veterinärmedizin stellten neueste Informationen zu Ausmaß und Geschwindigkeit des Klimawandels im Zusammenhang mit der Verbreitung von Infektionserregern vor. Einen Schwerpunkt bildete die Ausbreitung sogenannter „Vektoren“, wie beispielsweise verschiedener Insekten und Nagetiere, und die Auswirkung auf die erwartete Verbreitung der von ihnen übertragenen Infektionen bei Mensch und Tier. Über 100 Wissenschaftler aus aller Welt, so z. B. aus Belgien, Finnland, Frankreich, Indien, Israel und den USA, nahmen an der Tagung teil, über die sowohl regional als auch überregional berichtet wurde.

Zu den Vortragsthemen der Tagung zählten durch Zecken übertragene Krankheiten. Hierzu veranstaltet das FLI im März das „X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases“ mit rund 300 Teilnehmern in Weimar. Das Thema Zecken sorgte auch nach der Tagung für zahlreiche Anfragen.

Ist Klonfleisch gefährlich? Auch diese Frage beschäftigte die Medien, die hierzu die wissenschaftliche Einschätzung des FLI einholten.

Vor allem in agrarspezifischen Medien wurden Themen wie Rindertuberkulose, Impfungen gegen Blauzungenkrankheit, Auswirkungen von Ferkelklappen auf die Frühentwicklung der Tiere oder die optimale Ausgestaltung von Geflügelvolieren aufgegriffen.

Aus dem Terminkalender 2009

25. – 26. Februar

Klausurtagung der Staatssekretäre der für die Lebensmittelsicherheit und die Tiergesundheit zuständigen Ministerien am FLI Insel Riems

23. April

Girls' Day und Zukunftstag an den FLI-Standorten Braunschweig, Celle, Mariensee, auf der Insel Riems und in Wusterhausen

4. September

Richtfest für den Neubau am Standort Insel Riems mit rund 400 Gästen

21. – 25. September

Woche der Ressortforschung: Vorträge „Rinderwahnsinn – schon vergessen?“ und „Schweinegrippe oder Influenza des Menschen: Informationen zu einem neuen Erreger“ im Alfried Krupp Wissenschaftskolleg, Greifswald

15. – 17. Oktober

Wissenschaftszug „Expedition Zukunft“ in Greifswald: Vortrag „Seuchen kennen keine Grenzen“

Aus dem Medienkalender

März

„Zecken auf dem Vormarsch“: Berichterstattung zum „X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases“ und Interviews mit Dr. Jochen Süß, Leiter des Nationalen Referenzlabors für durch Zecken übertragene Krankheiten des FLI in Jena, zum Thema im ARD-Mittagsmagazin, Thüringen-Journal und weiteren Sendeformaten des MDR

21. Mai

Interview zu Epigenetik mit Prof. Dr. Heiner Niemann, Leiter des Instituts für Nutztiergenetik des FLI in Mariensee, in der ZDF-Sendung „Abenteuer Wissen“

25. Mai

Radiobeitrag „Montalk“ mit Peter Gaymann: Überraschungsgast: Dr. Lars Schrader, Leiter des Instituts für Tierschutz und Tierhaltung des FLI in Celle, bei WDR2

30. Mai

Bericht „Mücken als Krisengewinner: Immer mehr exotische Krankheiten erreichen Europa – Erreger profitieren von Klimawandel und Globalisierung“ zur Tagung „Climate change and infectious diseases“ in der Sueddeutschen Zeitung

Juni/Juli

Reportage „Die Insel der Viren – Riems forscht für die Welt“ über das FLI am Standort Insel Riems im Magazin „mare“

16.9.

„Was tun gegen Seuchen?“ Interviews mit Dr. Timm Harder, Leiter des Nationalen Referenzlabors für aviäre Influenza des FLI, und Dipl.-Ing. René Stenzel, stellvertretender Leiter des Technischen Dienstes am Standort Insel Riems, für die Sendung „Xenius“ des Fernsehsenders arte

2.12.

Warnung vor Sorglosigkeit bei BSE – Radiointerview mit dem Präsidenten des FLI, Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas C. Mettenleiter, bei Antenne MV

VIII. KOOPERATIONEN MIT HOCHSCHULEN UND MITARBEIT IN WISSENSCHAFTLICHEN GREMIEN

1 VORLESUNGS- UND HOCHSCHULTÄTIGKEITEN

Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des FLI arbeiten mit nationalen und internationalen Universitäten in der Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses und der Weiterbildung von Veterinären und wissenschaftlichem Personal zusammen.

In 2009 wurde Prof. Dr. Thomas Selhorst (IfE) zum außerplanmäßigen Professor für prognostische Epidemiologie an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn ernannt.

Lehraufträge und Ausbildungskooperationen bestehen zu folgenden Einrichtungen:

Name	Hochschule
PD Dr. Ansgar Aschfalk (IfE)	Universität Hohenheim
Dr. Anne Balkema-Buschmann (INNT)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Dr. Sven M. Bergmann (IMED)	Technical University of Szczecin, Polen
Dr. Jutta Berk (ITT)	Georg-August-Universität Göttingen
Dr. Angela Berndt (IMP)	Universität Leipzig
PD Dr. Franz J. Conraths (IfE)	Freie Universität Berlin
PD Dr. Stefan Finke (IMB)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Dr. Andreas Fröhlich (IfE)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Dr. Jörn M. Gethmann (IfE)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Dr. Lutz Geue (IfE)	Freie Universität Berlin
Dr. habil. Harald Granzow (IMED)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Prof. Dr. Martin H. Groschup (INNT)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Prof. Dr. Roland Großmann (ING)	China Agricultural University, Centre of Life Sciences Beijing; College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University; Shanghai Academy of Agricultural Sciences (alle VR China)
PD Dr. Christian Grund (IVD)	Ludwig-Maximilians-Universität München
PD Dr. Ingrid Halle (ITE)	Georg-August-Universität Göttingen; Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
PD Dr. Timm Harder (IVD)	Universitätsklinikum Kiel
Dr. Christine Hoffmann (INNT)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Dr. habil. Volker Kaden (IMED)	Universität Rostock
PhD Kristina Kadlec (ING)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
PD Dr. Helge Kampen (IMED)	Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Dr. Matthias Kramer (IfE)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Universität Leipzig
PD Dr. Wilfried A. Kues (ING)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Prof. Dr. Elisabeth Liebler-Tenorio (IMP)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Dr. Michael Marahrens (ITT)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
PD Dr. Christian Menge (IMP)	Justus-Liebig-Universität Gießen
Dr. Ulrich Methner (IBIZ)	Freie Universität Berlin

Name	Hochschule
Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas C. Mettenleiter (IMB)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
PD Dr. Heinrich Neubauer (IBIZ)	Universität Leipzig
Prof. Dr. Heiner Niemann (ING)	Christian-Albrechts-Universität Kiel; FH Südwestfalen, Soest; Medizinische Hochschule Hannover; Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Kinki University, Institute for Advanced Technologies, Japan
Prof. Dr. Nahid Parvizi (ING)	Leibniz Universität Hannover; Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Dr. Benjamin Petsch (IfI)	Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Prof. Dr. Oliver Planz (IfI)	Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Prof. Dr. Detlef Rath (ING)	Christian-Albrechts-Universität Kiel; FH Südwestfalen, Soest; Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Universität Murcia, Spanien
PD Dr. Petra Reinhold, PhD (IMP)	Freie Universität Berlin
Dr. Lars Schrader (ITT)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Prof. Dr. Stefan Schwarz (ING)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; Justus-Liebig-Universität Gießen; Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Prof. Dr. Thomas Selhorst (IfE)	Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Dr. Christian Seyboldt (IBIZ)	Freie Universität Berlin
Dr. Christoph Staubach (IfE)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Dr. Jürgen Stech (IMB)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Prof. Dr. Lothar Stitz (IfI)	Eberhard-Karls-Universität Tübingen; Justus-Liebig-Universität Gießen
PD Dr. Jochen Süss (IBIZ)	Friedrich-Schiller-Universität Jena
Prof. Dr. Jens Peter Teifke (IMED)	Justus-Liebig-Universität Gießen
Dr. Jürgen Teuffert (IfE)	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
PD Dr. Herbert Tomaso (IBIZ)	Friedrich-Schiller-Universität Jena; Medizinische Universität Graz, Österreich
PD Dr. Rainer G. Ulrich (INNT)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
PD Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp (IMED)	Freie Universität Berlin; North Carolina State University Raleigh, USA

2 MITGLIEDSCHAFTEN IN WISSENSCHAFTLICHEN GREMIEN

Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des FLI arbeiten aktiv in wissenschaftlichen Gremien nationaler und internationaler Organisationen mit. Darüber hinaus sind sie Mitglieder in zahlreichen wissenschaftlichen Gesellschaften und Fachverbänden, die im Einzelnen aus Platz Gründen nicht aufgelistet werden können. Deshalb werden in der nachfolgenden Tabelle werden solchen Funktionen verbunden sind.

Name	Wissenschaftliches Gremium / Fachgesellschaften
Dr. Ulrich Baulain (ING)	Arbeitsausschuss für Leistungsprüfung und Zuchtwertfeststellung beim Schwein des Zentralverbandes der Deutschen Schweineproduktion e.V. (ZDS)
PD Dr. Martin Beer (IVD):	Arbeitsgruppe CSF Meat Safety & Wild Boar Control der European Food Safety Authority (EFSA); Fachbeirat für Rinderzucht im Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei in Mecklenburg-Vorpommern; Rat für Agrarwissenschaften in Mecklenburg-Vorpommern (RAW); Kuratorium der Akademie für Tiergesundheit (AFT) e.V.
Dr. Sven M. Bergmann (IMED):	Schatzmeister der European Association of Fish Pathologists (EAFP)
Dr. Jutta Berk (ITT):	AG der Länderreferenten Eier und Geflügel, Mast sowie AG zur Überarbeitung der „Bundeseinheitlichen Eckwerte für eine freiwillige Vereinbarung zur Haltung von Jungmasthühnern (Broiler, Masthähnchen) und Mastputen (BMELV); Sachverständigengruppe „Putenvereinbarung“ des Ministeriums für Landwirtschaft und Umwelt des Landes Sachsen-Anhalt; Sachverständigengruppe „Weiterentwicklung der Niedersächsischen Putenvereinbarung“ des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Sachverständigengruppe „Initiative Nachhaltige Deutsche Putenwirtschaft“, AG Tierschutz Arbeitskreis für Geflügelhaltung Deutschland-Belgien-Niederlande
Dr. Sandra Blome (IVD):	Arbeitsgruppe ASF der European Food Safety Authority (EFSA); Leiterin AG Diagnostik und Mitglied der AG TSBH NI/NRW, LAVES Niedersachsen
Dr. Anne Buschmann (INNT):	Arbeitsgruppen „Feeding of non-ruminant MBM to chicken and pigs“ „TSE risk from carcasses of ovine and caprine animals below 6 months of age“ und „Working Group to review TSE testing protocols“ der European Food Safety Authority (EFSA); Arbeitsgruppe „Gesamtstrategie Blutversorgung angesichts vCJK“ am Paul-Ehrlich-Institut
PD Dr. Franz J. Conraths (IfE):	Advisory Board „Animal Health and Animal Welfare“ der European Food Safety Authority (EFSA); Executive Committee Member von EPIZONE (Network of Excellence); Vorstandsmitglied der Landesvereinigung außeruniversitäre Forschung Brandenburg e.V.; Ausschuss Tierseuchenbekämpfung der Bundestierärztekammer

Name	Wissenschaftliches Gremium / Fachgesellschaften
Prof. Dr. Sven Dänicke (ITE):	Kommission „Kontaminanten und andere gesundheitlich relevante Stoffe in der Lebensmittelkette“ des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR); Arbeitsgruppe „Carry over unerwünschter Stoffe“ des BMELV und Senatsarbeitsgruppe „Mykotoxine“; Wissenschaftlicher Beirat des Forschungsinstituts für Futtermitteltechnik Braunschweig-Thune
Dr. Susanne Döll (ITE):	Senatsarbeitsgruppe „Synthetische Nanomaterialien“
Dr. Dieter Fichtner (IMED):	Ausschuss Fische der Bundestierärztekammer
Dr. Uwe Fischer (IMED):	Tierversuchskommission nach §15 TschG des Bundeslandes Mecklenburg-Vorpommern; Mitglied des Peer Review College des Danish Council for Strategic Research; Board member der European Veterinary Immunology Group (EVIG)
Prof. Dr. Gerhard Flachowsky (ITE):	Wissenschaftlicher Beirat und Kommissionsmitglied "GMO" des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR); Mitglied im GMO-Panel sowie verschiedener Arbeitsgruppen der European Food Safety Authority (EFSA); Global Feed Initiative der Welternährungsorganisation (FAO); Präsidiumsmitglied der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ); Arbeitskreis "Futter und Fütterung" der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG); Vorsitzender des Ausschusses für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE)
Dr. Jörn M. Gethmann (IfE)	Arbeitsgruppe „Enhancing bluetongue monitoring and surveillance in the EU“, DG SANCO, Europäische Kommission
Dr. Lutz Geue (IfE):	stellvertretender Vorsitzender der Tierschutzkommission des Landes Brandenburg
Dr.Dr. h.c.mult. Eildert Groeneveld (ING)	Berater der Tierzuchtreferenten des Bundes und der Länder in züchterischen Fragen; Advisory Committee des "Department of Agriculture Production and Food Science and Technology" der Cyprus University of Technology; Zentrum für Evolutionäre und Experimentelle Biodiversität (ZEEB), Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Arbeitsausschuss für Zuchtwertschätzung der AG Deutscher Rinderzüchter e.V. (ADR); Genetisch-Statistischer Ausschuss und Fachbeirat "Tiergenetische Ressourcen" der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ); Vize-Präsident der „Working Group on Animal Genetic Resources“ und Mitglied der Deutschen Vertretergruppe der Kommission für Tiergenetik der Europäischen Vereinigung für Tierproduktion (EAAP); 2. Vorsitzender und Schriftführer der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften (GfT)
Prof. Dr. Martin H. Groschup (INNT):	Research Advisory Group (RAG) des Britischen Verbraucherschutzministeriums (DEFRA); TSE community reference laboratory strain typing expert group (STEG) der Europäischen Kommission; Arbeitsgruppen „BSE in tongue“, „Evaluation TSE tests“ und „SRM back calculation“ sowie National TSE Focal point“ der European Food Safety Authority (EFSA); Experten Gruppe "Confirmatory TSE tests" der OIE; Arbeitskreis "TSE" der Task-Force Tierseuchen der Bundesländer; Scientific Advisory Board von PrioNet Canada

Name	Wissenschaftliches Gremium / Fachgesellschaften
Prof. Dr. Roland Großmann (ING)	Arbeitsgruppe "Physiologie" (Deutsche Gruppe) der Europäischen Vereinigung für Tierproduktion (EAAP); Prüfungsausschuss für die Anerkennung als Fachtierarzt für Physiologie und Physiologische Chemie und Prüfungsausschuss für die Anerkennung als Fachtierarzt für Molekulargenetik und Gentechnologie der Landestierärztekammer; Life-time member (elected) des Darwin College, Cambridge/UK
Dr. Bernd Haas (IVD):	Arbeitskreis TRBA 120 "Versuchstierhaltung" im Unterausschuss 2 "Schutzmaßnahmen" des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS); Arbeitsgruppe "Klasse 6.2" (Infektiöses Gefahrgut) im Ausschuss Gefahrgutbeförderung (AGGB) im Gefahrgut-Verkehrs-Beirat des Bundesministeriums für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung (BMBVS); FAO Research Group of the Standing Technical Committee for the Control of Foot-and-Mouth Disease (EUFMD)
PD Dr. Ingrid Halle (ITE):	Kommission für Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe in der Tierernährung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR); FEEDAP Panel (Additives and products or substances used in animal feed) der European Food Safety Authority (EFSA); Fachgruppe „Tierernährung“ der Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP); Vorstand der Deutschen Vereinigung für Geflügelwissenschaft und Mitglied der Europäischen Arbeitsgruppe 2 „Nutrition of Poultry“ der World's Poultry Science Association (WPSA); Fachgruppe Geflügelfutter im Verein Futtermitteltest
PD Dr. Timm Harder (IVD):	Expertengruppe „Influenza-Pandemieplanung“ des Bundesministeriums für Gesundheit; Chairman der Technical Group „RNA Standards“ und Vice-Chairman der Technical Group „Commercial Assays“ (beide OFFLU, OIE/FAO Network of Expertise on Animal Influenza)
Dr. Martin Heller (IBIZ):	Tierschutzkommission nach § 15 TSchG des Freistaats Thüringen
Dr. Martina Henning (ING)	2. Vorsitzende der Tierversuchskommission nach § 15 TierSchG des Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES); Projektgruppen „Fleischerzeugung“ und „Tiergenetische Ressourcen“ der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ); Vorsitzende des Prüfungsausschusses für die Anerkennung als Fachtierarzt für Molekulargenetik und Gentechnologie der Landestierärztekammer Niedersachsen
Dr. Bernd Hoffmann (IVD):	Vorstand des Arbeitskreises Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID)
Dr. Detlef W. Höreth-Böntgen (IfE):	Community Veterinary Emergency Team der Europäischen Kommission
Dr. Helmut Hotzel (IBIZ):	§ 64 LFGB-Arbeitsgruppe „Molekularbiologische Methoden Mikrobiologie“ des BMELV; Arbeitsgruppe „Molekulare diagnostische Verfahren“ des Arbeitskreises Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID)

Name	Wissenschaftliches Gremium / Fachgesellschaften
Dr. habil. Volker Kaden (IMED):	Fachbeirat für Schweinezucht der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern; Arbeitskreis „Tierische Produktion“ des Rats für Agrarwissenschaften Mecklenburg-Vorpommern (RAW); Ausschuss für „Desinfektion in der Veterinärmedizin“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)
PD Dr. Robert Kammerer (IfI):	Tierschutzbeauftragter und stellvertretendes Mitglied in der Tierschutzkommission im Regierungspräsidium Tübingen
PD Dr. Helge Kampen (IMED):	2. Vorsitzender der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Entomologie und Acarologie (DGMEA)
Dr. Heike Köhler (IMP):	Tierschutzkommission nach § 15 TSchG des Freistaats Thüringen
Dr. Peter Köhler (ING)	Fachgruppe V (Tierernährung) und Fachgruppe VI (Futtermittel) des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA); Gründungsmitglied des Vereins D-NOTES e.V.
Dr. Matthias Kramer (IfE):	„Standing Committee on Agricultural Research (SCAR)- Animal Health Working Group“, DG Research; „TSE Working Group“, DG-SANCO; Community Veterinary Emergency Team und Task Force „Animal Disease Surveillance“ der Europäischen Kommission; Arbeitsgruppe „GBR Up-date Methodology“ der European Food Safety Authority (EFSA)
Dr. Elke Lange (IMED):	Arbeitskreis Landwirtschaft des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV)
Dr. Michael Marahrens (ITT):	Nationaler Experte für Tierschutzfragen bei Transport und Schlachtung der EC-DG SANCO (DG Gesundheit und Verbraucherschutz); Europäisches Lebensmittel- und Veterinäramt - The Food and Veterinary Office (FVO); Arbeitsgruppe „Kontrolle Nutztierhaltungen“ der Länderarbeitsgemeinschaft gesundheitlicher Verbraucherschutz (LAGV); Arbeitsgruppe Tierschutz (AGT) der Verbraucherschutzministerkonferenz (LAV); Vorstandsmitglied, Vorsitzender des Arbeitskreises 5 (Handel und Transport) und Mitglied des Arbeitskreises 3 (Betäubung und Schlachtung) der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz
Dr. Falk Melzer (IBIZ):	Arbeitsgruppe „Brucellosis in pigs“ der European Food Safety Authority (EFSA)
PD Dr. Christian Menge (IMP):	Interner Beirat der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen Ausschuss „Desinfektion in der Veterinärmedizin“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)
Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter (IMB):	OIE Scientific Committee for Animal Diseases; Präsident des Senats der Bundesforschungsinstitute des BMELV; Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und der Akademie der Wissenschaften in Hamburg; Vorsitzender des Wissenschaftlichen Beirats des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) Dummerstorf; Wissenschaftlicher Beirat des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI) und des Zentrums für Veterinary Public Health, Universität Leipzig; Beirat der Gesellschaft für Virologie (GFV)

Name	Wissenschaftliches Gremium / Fachgesellschaften
Dr. Ulrich Meyer (ITE):	Kommission für Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe in der Tierernährung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR); Senatsarbeitsgruppe „Ökobilanzierung“; Experte Deutsch-Niederländische Arbeitsgruppe für Rinderhaltung; Ausschuss für Futtermittelkonservierung und Fütterung, Deutsches Maiskomitee (DMK)
Dr. Thomas Müller (IfE):	EC Task Force Animal Disease Surveillance, rabies subgroup Leiter „Demonstration projects“ der Vereinigung Partner for Rabies Prevention (PRP); Technical Advisory Board der Alliance for Rabies Control
Dr. Wolfgang Müller (ITT):	Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung AKS - Staatliche Akkreditierungsstelle Hannover, Gutachter
PD Dr. Heinrich Neubauer (IBIZ):	Kommission für Biologische Gefahren des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR); Bio-Subgroup der Task Force "Chemical, Biological, Radiological and Nuclear" (CBRN TF) der EC - DG Justice Arbeitsgruppe „Brucellosis in pigs“ der European Food Safety Authority (EFSA); Wehrwissenschaftlicher Ausschuss des Verteidigungsministeriums der Republik Österreich; Vorsitzender der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)
Prof. Dr. Heiner Niemann (ING)	Arbeitsgruppe "Safety of products from cloned animals" und "Safety assessment of foods derived from recombinant-DNA animals" der European Food Safety Authority (EFSA); Kommission „Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel“ des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR); Beiratsmitglied im Fugato Scientific Advisory Board; Steering Committee des Exzellenzclusters REBIRTH (From Regenerative Biology to Reconstructive Therapy) an der Medizinischen Hochschule Hannover; Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina - Nationale Akademie der Wissenschaften; Fachbeiratsvorsitzender der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde (DGfZ); Vorstandsmitglied der Yak-Camel-Stiftung; Evaluierungskommission der University Utrecht (NL) Faculty of Veterinary Medicine
Dr. Peter Otto (IBIZ):	§ 64 LFGB-Arbeitsgruppe „Viren“, BMELV
Prof. Dr. Nahid Parvizi (ING)	Europäische Fachgruppe „Physiology and Endocrinology of Pregnancy and Parturition“; Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie; International Society of Neuroendocrinology
Prof. Dr. Detlef Rath (ING)	8. Tierversuchskommission des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES); Vorsitzender des Virtuellen Zentrums für Reproduktionsmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover; Standing Committee „International Boar Semen Preservation“; Fachbereich „Tiergenetische Ressourcen“ der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ); Vorstand, Programme Secretary und Country Representative der European Society for Domestic Animal Reproduction“ (ESDAR)
Dr. Astrid Raßbach (IBIZ):	Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung, AKS - Staatliche Akkreditierungsstelle Hannover, Gutachter

Name	Wissenschaftliches Gremium / Fachgesellschaften
PD Dr. Dr. Petra Reinhold (IMP):	Europäischer Sekretär der Veterinary & Comparative Respiratory Society" (VCRS); Wissenschaftlicher Beirat der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DPG) Sektion "Pathophysiologie und Aerosolmedizin"; Leiterin des Arbeitskreises „Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG); Mitglied der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Breath Research Unit
Dr. Konrad Sachse (IMP):	Subcommittees on the Taxonomy of Mollicutes & Chlamydiales of the International Committee of Systematic Bacteriology (ICSB); Arbeitsgruppe "Molekulare diagnostische Verfahren" des Arbeitskreises Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID); Board member der European Society for Chlamydia Research; Working Team on Ruminant Mycoplasmas der International Organization for Mycoplasmaology (IOM); Interner Beirat der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen
Dr. Horst Schirrmeier (IVD):	Fachbeirat „Schaf- und Ziegenzucht Mecklenburg-Vorpommern" im Bundesland Mecklenburg-Vorpommern; Vorstand des Arbeitskreises Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID)
Dr. Lars Schrader (ITT):	Mitglied des Senats der Bundesforschungsinstitute des BMELV; Fachausschuss „Tiergerechtigkeit" der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG); Mitglied im Hauptausschuss sowie der Arbeitsgemeinschaft „Technik und Bauen in der Nutztierhaltung" des Kuratoriums für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL)
Prof. Dr. Stefan Schwarz (ING)	Subcommittees „Generation, Presentation and Application of AST Data for Bacteria of Animal Origin" und „Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing" sowie der Working Groups Education, Generics, International Harmonization, and Editorial des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); Vorsitzender der interdisziplinären Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz" und Mitglied der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG); Stellvertretender Vorsitzender der Arbeitsgruppe „Molekulare Methoden der Resistenzbestimmung" der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG); Mitglied des Prüfungsausschusses „Fachtierarzt für Molekulargenetik und Gentechnologie" und des Prüfungsausschusses „Fachtierarzt für Epidemiologie" der Landestierärztekammer Niedersachsen
Prof. Dr. Thomas Selhorst (IfE):	Vorsitzender der Fachgruppe Epidemiologie und Dokumentation der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft
Dr. Markus Spolders (ITE):	Stellvertretendes Mitglied der Tierschutzkommission nach § 15 TSchG des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
Dr. Christoph Staubach (IfE):	Arbeitsgruppe „Enhancing bluetongue monitoring and surveillance in the EU", DG SANCO, Europäische Kommission; Arbeitsgruppe „Räumliche Statistik" der deutschen Region der Internationalen Biometrischen Gesellschaft

Name	Wissenschaftliches Gremium / Fachgesellschaften
Prof. Dr. Lothar Stitz (IfI):	Tierschutzkommission, Regierungspräsidium Tübingen
PD Dr. Jochen Süß (IBIZ):	Working group TBE der Weltgesundheitsorganisation (WHO); Fachbeirat „Forum Impfen“ der Akademie für Gemeinnützige Wissenschaften zu Erfurt European Advisory Board on TBE; International Study Working Group on TBE
Prof. Dr. Jens Peter Teifke (IMED):	Diplomate des American College of Veterinary Pathologists (ACVP); Stellvertretender Vorsitzender des Arbeitskreises Tiermedizin der Vereinigung deutscher Sanitätsoffiziere (VdSO) der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie; Auswahlausschuss für Studienanfänger der Studienstiftung des Deutschen Volkes
Dr. Steffen Weigend (ING)	Beirat „Biodiversität und genetische Ressourcen“ des BMELV; FAO Arbeitsgruppe für Tiergenetische Diversitätsbewertung; Vorsitzender des Fachbeirats Tiergenetische Ressourcen der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ); Arbeitsgruppe für Tiergenetische Diversitätsbewertung der International Society for Animal Genetics (ISAG) Vorsitzender der AG 3 „Züchtung und Genetik“ der Weltvereinigung für Geflügelwissenschaften (WPSA)
PD Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp (IMED):	Stellvertretender Vorsitzender der Arbeitsgruppe „Immunbiologie von Virusinfektionen“ der Gesellschaft für Virologie (GfV); Vorstandsmitglied Landestierärztekammer Mecklenburg-Vorpommern; Vorsitzender „Feline Component“ des Veterinary Immunology Committee (VIC)
Dr. Frank-Dieter Zerbe (ITT):	Fachausschuss „Tiergerechtigkeit“ der Deutschen Landwirtschafts Gesellschaft e.V. (DLG)

3 REDAKTIONELLE MITARBEIT IN WISSENSCHAFTLICHEN ZEITSCHRIFTEN

Name	Wissenschaftliche Zeitschriften
Dr. Jutta Berk (ITT)	Editorial Board Member: Landbauforschung Völknerode
PD Dr. Franz J. Conraths (IfE)	Editorial Board Member: Zoonoses and Public Health
Prof. Dr. Sven Dänicke (ITE)	Editorial Board Member: Archiv für Geflügelkunde - European Poultry Science; Archives of Animal Nutrition; Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research und Mycotoxin Research
Prof. Dr. Gerhard Flachowsky (ITE)	Book Review Editor: Animal Feed Science and Technology Editorial Board Member: Archives of Animal Nutrition; Italian Journal of Animal Science; Journal of Animal and Feed Science; Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition; Journal of Applied Animal Research; Übersichten zur Tierernährung

Name	Wissenschaftliche Zeitschriften
Prof. Dr. Martin H. Groschup (INNT)	Editorial Board Member: Journal of General Virology; Veterinary Research
PD Dr. Christian Grund (IVD)	Wissenschaftlicher Beirat: Tierärztliche Praxis
PD Dr. Ingrid Halle (ITE)	Editorial Board Member: Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research
PD Dr. Timm Harder (IVD)	Editorial Board Member: Journal of General Virology Wissenschaftlicher Beirat: Veterinary Medicine International
Dr. habil. Volker Kaden (IMED)	Wissenschaftlicher Beirat: Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
Dr. Günther Keil (IMB)	Editor: Archives of Virology
Dr. Joergen Kjaer (ITT)	Board of Directors: British Poultry Science Ltd. Editorial Board Member: Applied Animal Behaviour Science
Dr. Barbara G. Klupp (IMB)	Editorial Board Member: Archives of Virology
Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter (IMB)	Editorial Board Member: OIE Scientific and Technical Review; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Journal of Virology; Transboundary and Emerging Diseases
Dr. Thomas Müller (IfE)	Editorial Advisory Board: Veterinary Microbiology
PD Dr. Dr. Petra Reinhold (IMP)	Fachgutachterin DTW Editorial Board Member: Journal of Breath Research
Dr. Konrad Sachse (IMP)	Editorial Board Member: Molecular and Cellular Probes; The Veterinary Journal; Veterinary Microbiology und Veterinary Research Communications
Dr. Lars Schrader (ITT)	Editorial Board Member: Landbauforschung Völkenrode
Dr. Markus Spolders (ITE)	Distinguished Referee: New Zealand Veterinary Journal
PD Dr. Jochen Süß (IBIZ)	Editor in Chief: Ticks and Tick-borne Diseases
PD Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp (IMED)	Editorial Board Member: Clinical and Vaccine Immunology und Veterinary Immunology and Immunopathology; Virus Genes
Dr. Dr. h.c. mult. Eildert Groeneveld (ING)	Editorial Board Member: Annals of Animal Science; Archiv für Tierzucht
Prof. Dr. Stefan Schwarz (ING)	Editor: FEMS Microbiology Letters; Journal of Antimicrobial Chemotherapy Editorial Board Member: Microbial Drug Resistance
Prof. Dr. Detlef Rath (ING)	Editorial Board Member: Reproduction in Domestic Animals; Slovenian Veterinary Research und Spanish Journal of Agricultural Research
Dr. Dr. h.c. mult. Eildert Groeneveld (ING)	Editorial Board Member: Veterinärmedizin und Zootechnik; Litauische Veterinärakademie
Prof. Dr. Stefan Schwarz (ING)	Editorial Board Member: Veterinární medicina (Vet Med - Czech); Veterinary Microbiology

IX. VERÖFFENTLICHUNGEN

1 VERÖFFENTLICHUNGEN DES FRIEDRICH- LOEFFLER-INSTITUTS

Jahresbericht 2008 / Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit. Greifswald-Insel Riems. 2008. 189 S. ISSN 1861-0005. www.fli.bund.de

Tiergesundheitsjahresbericht 2008 / Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit. Greifswald-Insel Riems und Wusterhausen. 9. Jahrgang 2009. 117 S. ISSN 1867-9374. www.fli.bund.de

Rabies Bulletin Europe / Hrsg.: C. Freuling, Th. Müller. Vol. 32, No. 3 und 4 (2008); Vol. 33, No. 1 und 2 (2009). ISSN 0257-8506. www.who-rabies-bulletin.org

Der Loeffler / Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald-Insel Riems, 3. Jahrgang 2009; Heft Nr. 5 und 6. ISSN 1868-1417.

Der LabLoeffler / Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald-Insel Riems, 2. Jahrgang 2009; Heft 2.

2 WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

2.1 VERÖFFENTLICHUNGEN IN REFERIERTEN ZEITSCHRIFTEN

ABDEL-MONEIM, A.S., S.A.S. SHANY, S.R. FEREDOUNI, B.T.M. EID, M.F. EL-KADY, E. STARICK, T. HARDER, AND G.M. KEIL. 2009. Sequence diversity of the haemagglutinin open reading frame of recent highly pathogenic avian influenza H5N1 isolates from Egypt. *Arch Virol* 154:1559-1562.

ABDEL-MONEIM, A. S., P. ZLOTOWSKI, J. VEITS, G. M. KEIL, AND J. P. TEIFKE. 2009. Immunohistochemistry for detection of avian infectious bronchitis virus strain M41 in the proventriculus and nervous system of experimentally infected chicken embryos. *Virology J* 6.

ADLER, H., S. EL-GOGO, S. GUGGEMOOS, W. ZIMMERMANN, N. BEAUCHEMIN, AND R. KAMMERER. 2009. Perturbation of lytic and latent gammaherpesvirus infection in the absence of the inhibitory receptor CEACAM1. *PLoS one* 4:e6317.

AL DAHOUK, S., S. LOISEL-MEYER, H. C. SCHOLZ, H. TOMASO, M. KERSTEN, A. HARDER, H. NEUBAUER, S. KOHLER, AND V. JUBIER-MAURIN. 2009. Proteomic analysis of *Brucella suis* under oxygen deficiency reveals flexibility in adaptive expression of various pathways. *Proteomics* 9:3011-3021.

AL-KHLEIF, A., I. M. DAMRIYASA, C. BAUER, C. MENGE, AND W. HERBST. 2009. A serosurvey for infections with *Leptospira* serovars in pigs from Bali, Indonesia. *Dtsch Tierärztl Wschr* 116:389-391.

BASSO, W., D. C. HERRMANN, F. J. CONRATHS, N. PANTCHEV, M. G. VRHOVEC, AND G. SCHARES. 2009. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. *Vet Parasitol* 159:162-166.

BASSO, W., G. MORE, M. A. QUIROGA, L. PARDINI, D. BACIGALUPE, L. VENTURINI, M. C. VALENZUELA, D. BALDUCCHI, P. MAKSIMOV, G. SCHARES, AND M. C. VENTURINI. 2009. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*) with fatal toxoplasmosis in Argentina. *Vet Parasitol* 161:201-206.

BASSO, W., S. SCHARES, A. BÄRWALD, D. C. HERRMANN, F. J. CONRATHS, N. PANTCHEV, M. G. VRHOVEC, AND G. SCHARES. 2009. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Vet Parasitol* 160:43-50.

BECK, J., H. B. URNOVITZ, M. H. GROSCHUP, U. ZIEGLER, B. BREINIG, AND E. SCHUTZ. 2009. Serum Nucleic Acids in an Experimental Bovine Transmissible Spongiform Encephalopathy Model. *Zoonoses Publ Health* 56:384-390.

BECKERT, A., L. GEUE, A. VOS, A. NEUBERT, C. FREULING, AND T. MÜLLER. 2009. Genetic stability (*in vivo*) of the attenuated oral rabies virus vaccine SAD B19. *Microbiol Immunol* 53:16-21.

BEHR, B., D. RATH, T. B. HILDEBRANDT, F. GOERITZ, S. BLOTTNER, T. J. PORTAS, B. R. BRYANT, B. SIEG, A. KNIERIEM, S. P. DE GRAAF, W. M. C. MAXWELL, AND R. HERMES. 2009. Germany/Australia Index of Sperm Sex Sortability in Elephants and Rhinoceros. *Reprod Dom Anim* 44:273-277.

BEHR, B., D. RATH, P. MUELLER, T. B. HILDEBRANDT, F. GOERITZ, B. C. BRAUN, T. LEAHY, S. P. DE GRAAF, W. M. C. MAXWELL, AND R. HERMES. 2009. Feasibility of sex-sorting sperm from the white and the black rhinoceros (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*). *Theriogenology* 72:353-364.

BEILAGE, E.G., H. NATHUESS, D. MEEMKEN, T.C. HARDER, M.G. DOHERR, I. GROTHA, AND I. GREISER-WILKE. 2009. Frequency of PRRS live vaccine virus (European and North American genotype) in vaccinated and non-vaccinated pigs submitted for respiratory tract diagnostics in North-Western Germany. *Prev Vet Med* 92:31-37.

BERK, J. 2009. Effect of litter type on prevalence and severity of pododermatitis in male broilers. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:257-263.

BERMEJO-ALVAREZ, P., P. LONERGAN, D. RATH, A. GUTIERREZ-ADAN, AND D. RIZOS. 2010. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced *in vitro* with sex-sorted sperm. *Reprod Fertil Dev* 22:426-436.

BERNDT, A., J. MÜLLER, L. BORSI, H. KOSMEHL, U. METHNER, AND A.

- BERNDT. 2009. Reorganisation of the caecal extracellular matrix upon *Salmonella* infection – relation between bacterial invasiveness and expression of virulence genes. *Vet Microbiol* 133:123-137.
- BIGARRÉ, L., M. BAUD, J. CABON, J. ANTYCHOWICZ, S. M. BERGMANN, M. ENGELSMAN, F. POZET, M. REICHERT, AND J. CASTRIC. 2009. Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. *J Virol Methods* 158:51-57.
- BLOCKEEL, C., P. MOCK, G. VERHEYEN, N. BOUCHE, P. LE GOFF, Y. HEYMAN, C. WRENZYCKI, K. HOFFMANN, H. NIEMANN, P. HAENTJENS, M. J. DE LOS SANTOS, M. FERNANDEZ-SANCHEZ, M. VELASCO, P. AEBISCHER, P. DEVROEY, AND C. SIMON. 2009. An *in vivo* culture system for human embryos using an encapsulation technology: a pilot study. *Human Reprod* 24:790-796.
- BODZSAR, N., H. EDING, T. REVAY, A. HIDAS, AND S. WEIGEND. 2009. Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. *Anim Genet* 40:516-523.
- BOGUHN, J., E. STROBEL, M. WITZIG, C. C. TEBBE, AND M. RODEHUTSCORD. 2008. Description of the structural diversity of rumen microbial communities *in vitro* using single-strand conformation polymorphism profiles. *Arch Anim Nutr* 62:454-467.
- BOLLWEIN, H., D. PROST, S. E. ULBRICH, H. NIEMANN, AND A. HONNENS. 2009. Effects of a shortened preovulatory follicular phase on genital blood flow and endometrial hormone receptor concentrations in Holstein-Friesian cows. *Theriogenology* 72:242-249.
- BRANDES, K., J. FRITSCHKE, N. MUELLER, B. KOERSCHGEN, B. DIERIG, G. STREBELOW, AND J. P. TEIFKE. 2009. Detection of Canine Oral Papillomavirus DNA in Conjunctival Epithelial Hyperplastic Lesions of Three Dogs. *Vet Pathol* 46:34-38.
- BRANDT, H., D.N. WERNER, U. BAULAIN, W. BRADE, AND F. WEISSMANN. 2009. Genotype-environment interactions for growth and carcass traits in different pig breeds kept under conventional and organic production systems. *Animal* [Epub ahead of print; doi:10.1017/S1751731109991509]
- BREHM, K.E., N.P. FERRIS, M. LENK, R. RIEBE, AND B. HAAS. 2009. Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Clin Microbiol* 47:3156-3160.
- BRENN, A., A. KARGER, M. SKIBA, U. ZIEGLER, AND M.H. GROSCHUP. 2009. A comprehensive proteome map of bovine cerebrospinal fluid. *Proteomics* 9:5199-5205.
- BREVES, G., AND P. LEBZIEN. 2009. Basic principles of intraruminal carbohydrate, protein and vitamin metabolism in lactating cows. *Züchtungskunde* 81:421-428.
- BROGLIA, A., J. HEIDRICH, P. LANFRANCHI, K. NÖCKLER, AND R. SCHUSTER. 2009. Experimental ELISA for diagnosis of ovine dicrocoeliosis and application in a field survey. *Parasitol Res* 104:949-953.
- BROOKES, S. M., R. M. IRVINE, A. NUNEZ, D. CLIFFORD, S. ESSEN, I. H. BROWN, K. VAN REETH, G. KUNTZ-SIMON, W. LOEFFEN, E. FONI, L. LARSEN, M. MATROSOVICH, M. BUBLOT, J. MALDONADO, M. BEER, AND G. CATTOLI. 2009. Influenza A (H1N1) infection in pigs. *Vet Rec* 164:760-761.
- BRUMM, H., R. SCHMIDT, AND L. SCHRADER. 2009. Noise-dependent vocal plasticity in domestic fowl. *Anim Behav* 78:741-746.
- CHANDY, S., M. OKUMURA, K. YOSHIMATSU, R.G. ULRICH, G.T. JOHN, P. ABRAHAM, J. ARIKAWA, AND G. SRIDHARAN. 2009. Hantavirus species in India: A retrospective study. *J Med Microbiol* 27:348-350.
- CONRATHS, F. J., J. M. GETHMANN, C. STAUBACH, T. C. METTENLEITER, M. BEER, AND B. HOFFMANN. 2009. Epidemiology of Bluetongue Virus Serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* 15:433-435.
- COY, P., J. GADEA, D. RATH, AND R. H. F. HUNTER. 2009. Differing sperm ability to penetrate the oocyte *in vivo* and *in vitro* as revealed using colloidal preparations. *Theriogenology* 72:1171-1179.
- DAUM, I., T. FINSTERBUSCH, S. HÄRTLE, T. W. GÖBEL, A. MANKERTZ, R. KORBEL, AND C. GRUND. 2009. Cloning and expression of a truncated pigeon circovirus capsid protein suitable for antibody detection in infected pigeons. *Avian Pathol* 38:135-141.
- DÄNICKE, S. 2009. Feed additives for detoxification of mycotoxins, rare earth elements and further feed additives. *Prakt Tierarzt* 90:856-864.
- DÄNICKE, S. AND S. DÖLL. 2010. A probiotic feed additive containing spores of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* does not prevent absorption and toxic effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol in piglets. *Food Chem Toxicol* 48:152-158.
- DÄNICKE, S., E. MOORS, A. BEINEKE, AND M. GAULY. 2009. *Ascaridia galli* infection of pullets and intestinal viscosity: consequences for nutrient retention and gut morphology. *Br Poultry Sci* 50:512-520.
- DÄNICKE, S., G. PAHLOW, T. GOYARTS, D. ROHWEDER, K. WILKERLING, G. BREVES, H. VALENTA, AND S. DÖLL. 2009. Effects of increasing concentrations of sodium metabisulphite (Na₂S₂O₅, SBS) on deoxynivalenol (DON) concentration and microbial spoilage of triticale kernels preserved without and with propionic acid at various moisture contents. *Mycotoxin Res* 25:215-223.
- DÄNICKE, S., AND H. SCHENKEL. 2009. On the importance of sulfur as unwanted compound in dairy cow feeding. *Züchtungskunde* 81:442-450.
- DERUELLE, M. J., C. VAN DEN BROEKE, H. J. NAUWYNCK, T. C. METTENLEITER, AND H. W. FAVOREEL. 2009. Pseudorabies virus US3- and UL49.5-dependent and -independent downregulation of MHC I cell surface expression in different cell types. *Virology* 395:172-181.
- DIECKHOFF, B., B. KESSLER, D. JOBST, W. KUES, B. PETERSEN, A. PFEIFER, R. KURTH, H. NIEMANN, E. WOLF, AND J. DENNER. 2009. Distribution and expression of porcine endogenous retroviruses in multi-transgenic pigs generated for

- xenotransplantation. *Xenotransplantation* 16:64-73.
- DÖLL, S., J. A. SCHRICKX, S. DÄNICKE, AND J. FINK-GREMMELS. 2009. Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages. *Toxicol Lett* 184:97-106.
- DÖLL, S., J. A. SCHRICKX, S. DÄNICKE, AND J. FINK-GREMMELS. 2009. Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytokine excretion and mRNA expression in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. *Toxicol Lett* 190:96-105.
- DÖLL, S., J. A. SCHRICKX, H. VALENTA, S. DÄNICKE, AND J. FINK-GREMMELS. 2009. Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytotoxicity protein synthesis and metabolism of DON in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. *Toxicol Lett* 189:121-129.
- ELSCHNER, M. C., C. U. KLAUS, E. LIEBLER-TENORIO, G. SCHMOOCK, P. WOHLSEIN, O. TINSCHMANN, E. LANGE, V. KADEN, R. KLOPFLEISCH, F. MELZER, A. RASSBACK, AND H. NEUBAUER. 2009. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Vet Edu* 21:147-150.
- ESCHBAUMER, M., B. HOFFMANN, P. KÖNIG, J. P. TEIFKE, J. GETHMANN, F. J. CONRATHS, C. PROBST, T. C. METTENLEITER, AND M. BEER. 2009. Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Vaccine* 27:4169-4175.
- FEREIDOUNI, S.R., M. BEER, T. VAHLENKAMP, AND E. STARICK. 2009. Differentiation of Two Distinct Clusters Among Currently Circulating Influenza A(H1N1) Viruses, March-September 2009. *Eurosurveillance* 14:2-4.
- FEREIDOUNI, S., E. STARICK, M. BEER, H. WILKING, D. KALTHOFF, C. GRUND, R. HÄUSLAIGNER, A. BREITHAUPT, E. LANGE, AND T. HARDER. 2009. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Infection of Mallards with homo- (H5) and heterosubtypic (H4) Immunity induced by Low Pathogenic Avian Influenza Virus. *PLoS one* 4.
- FEREIDOUNI, S. R., E. STARICK, C. GRUND, A. GLOBIG, T. C. METTENLEITER, M. BEER, AND T. HARDER. 2009. Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Vet Microbiol* 135:253-260.
- FLACHOWSKY, G. AND P. LEBZIEN. 2009. Comments on *in vitro* studies with methane inhibitors. *Anim Feed Sci Technol* 151:337-339.
- FLACHOWSKY, G., P. LEBZIEN, AND U. MEYER. 2009. Deduction of energy and nutrient requirements for high yielding cows. *Züchtungskunde* 81:429-441.
- FLACHOWSKY, G. AND S. HACHENBERG. 2009. Climate discussion: How are footprints to be assessed? Studies to the relevance of climate in meat production. *Fleischwirtschaft* 89:13-18.
- FLACHOWSKY, G. AND S. HACHENBERG. 2009. CO₂-Footprints for Food of Animal Origin - Present Stage and Open Questions. *J Verbrauchersch Lebensmittelsicherh* 4:190-198.
- FLISIKOWSKI, K., H. SCHWARZENBACHER, M. WYSOCKI, S. WEIGEND, R. PREISINGER, J. B. KJAER, AND R. FRIES. 2009. Variation in neighbouring genes of the dopaminergic and serotonergic systems affects feather pecking behaviour of laying hens. *Anim Genet* 40:192-199.
- FOOKS, A.R., N. JOHNSON, C.M. FREULING, P.R. WAKELEY, A.C. BANYARD, L.M. McELHINNEY, D.A. MARSTON, A. DASTJERDI, E. WRIGHT, R.A. WEISS, AND T. MÜLLER. 2009. Emerging Technologies for the Detection of Rabies Virus: Challenges and Hopes in the 21st Century. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e530.
- FOOKS, A. R., N. JOHNSON, T. MÜLLER, A. VOS, K. MANSFIELD, D. HICKS, A. NUNEZ, C. FREULING, L. NEUBERT, I. KAIPF, A. DENZINGER, R. FRANKA, AND C. E. RUPPRECHT. 2009. Detection of High Levels of European Bat Lyssavirus Type-1 Viral RNA in the Thyroid Gland of Experimentally-Infected *Eptesicus fuscus* Bats. *Zoonoses Publ Health* 56:270-277
- FRANKE, K., U. MEYER, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Distillers dried grains with solubles compared with rapeseed meal in rations of dairy cows. *J Anim Feed Sci* 18:601-612.
- FRANKE, K., U. MEYER, H. WAGNER, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Influence of various iodine supplementation levels and two different iodine species on the iodine content of the milk of cows fed rapeseed meal or distillers dried grains with solubles as the protein source. *J Dairy Sci* 92:4514-4523.
- FRANKE, K., U. MEYER, H. WAGNER, H.O. HOPPEN, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Effect of various iodine supplementations, rapeseed meal application and two different iodine species on the iodine status and iodine excretion of dairy cows. *Livestock Sci* 125:223-231.
- FRANZ, M., K. SPIEGEL, C. UMBREIT, P. RICHTER, C. CODINA-CANET, A. BERNDT, A. TENDORF-HOFMANN, S. KOSCIELNY, P. HYCKEL, H. KOSMEHL, I. VIRTANEN, AND A. BERNDT. 2009. Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol* 131:651-660.
- FREULING, C., A. VOS, N. JOHNSON, A.R. FOOKS, AND T. MÜLLER. 2009. Bat rabies – a Gordian knot? *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:425-433.
- FREULING, C., A. VOS, N. JOHNSON, I. KAIPF, A. DENZINGER, L. NEUBERT, K. MANSFIELD, D. HICKS, A. NUNEZ, N. TORDO, C. E. RUPPRECHT, A. R. FOOKS, AND T. MÜLLER. 2009. Experimental infection of Serotine bats (*Eptesicus serotinus*) with European bat lyssavirus type 1a (EBLV-1a). *J Gen Virol* 90:2493-2502.
- FRITSCHER-RAVENS, A., T. CUMING, B. JACOBSEN, F. SEEHUSEN, A. GHANBARI, E. KAHLE, A. VON HERBAY, P. KÖHLER, AND P. MILLA. 2009. Feasibility and safety of endoscopic full-thickness esophageal wall resection and defect closure: a prospective long-term survival animal study. *Gastrointest Endosc* 69:1314-1320.
- FRÖHLICH, J., G. BALJER, AND C. MENGE. 2009. Maternally and naturally acquired antibodies to Shiga toxins in a cohort of calves shedding shiga-toxigenic *E. coli* (STEC). *Appl*

- Environ Microbiol 75:3695-3704.
- FUCHS, T., R. THUN, N. PARVIZI, H. NATHUES, A. KOEHRMANN, S. ANDREWS, F. BROCK, G. KLEIN, N. SUDHAUS, AND E.G. BEILAGE. 2009. Effect of gonadotropin-releasing factor vaccine on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone concentrations and on the development of testicles and the expression of boar taint in male pigs. *Theriogenology* 72:672-680.
- FUCHS, W., B. G. KLUPP, H. GRANZOW, T. LEEGE, AND T. C. METTENLEITER. 2009. Characterization of Pseudorabies Virus (PrV) Cleavage-Encapsidation Proteins and Functional Complementation of PrV pUL32 by the Homologous Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol* 83:3930-3943.
- GABRIEL, G., K. KLINGEL, O. PLANZ, K. BIER, A. HERWIG, M. SAUTER, AND H.D. KLENK. 2009. Spread of Infection and Lymphocyte Depletion in Mice Depends on Polymerase of Influenza Virus. *Am J Pathol* 175:1178-1186.
- GAEDE, W., K. RECKLING, A. SCHLIEPHAKE, D. MISSAL, H. HOTZEL, AND K. SACHSE. 2009. Detection of *Chlamydomphila caviae* and *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* in horses with signs of rhinitis and conjunctivitis. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.011>].
- GALL, A., B. HOFFMANN, T. HARDER, C. GRUND, D. HÖPER, AND M. BEER. 2009. Design and Validation of a Microarray for Detection, Hemagglutinin Subtyping, and Pathotyping of Avian Influenza Viruses. *J Clin Microbiol* 47:327-334.
- GALL, A., B. HOFFMANN, T. HARDER, C. GRUND, R. EHRLICH, AND M. BEER. 2009. Rapid haemagglutinin subtyping and pathotyping of avian influenza viruses by a DNA microarray. *J Virol Meth* 160:200-205.
- GALL, A., B. HOFFMANN, T. HARDER, C. GRUND, R. EHRLICH, AND M. BEER. 2009. Rapid and Highly Sensitive Neuraminidase Subtyping of Avian Influenza Viruses by Use of a Diagnostic DNA Microarray. *J Clin Microbiol* 47:2985-2988.
- GARRELS, W., W. A. KUES, U. BAULAIN, AND H. NIEMANN. 2009. Modulation of Telomerase Activity in Bovine Embryos using Cytoplasmatic Plasmid Injection. *Reprod Dom Anim* 44:85.
- GEBERT, C., C. WRENZYCKI, D. HERRMANN, D. GRÖGER, J. THIEL, R. REINHARDT, H. LEHRACH, P. HAJKOVA, A. LUCAS-HAHN, J. W. CARNWATH, AND H. NIEMANN. 2009. DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. *Genomics* 94:63-69.
- GEISSEN, M., H. MELLA, A. SAALMÜLLER, M. EIDEN, J. PROFT, E. PFAFF, H. M. SCHÄTZL, AND M. H. GROSCHUP. 2009. Inhibition of prion amplification by expression of dominant inhibitory mutants--a systematic insertion mutagenesis study. *Infect Disord Drug Targets* 9:40-47.
- GERNER, W., S. E. HAMMER, K. H. WIESMÜLLER, AND A. SAALMÜLLER. 2009. Identification of Major Histocompatibility Complex Restriction and Anchor Residues of Foot-and-Mouth Disease Virus-Derived Bovine T-Cell Epitopes. *J Virol* 83:4039-4050.
- GETHMANN, J., K. HÜTTNER, H. HEYNE, C. PROBST, M. ZILLER, M. BEER, B. HOFFMANN, T. C. METTENLEITER, AND F. J. CONRATHS. 2009. Comparative safety study of three inactivated BTV-8 vaccines in sheep and cattle under field conditions. *Vaccine* 27:4118-4126.
- GEUE, L., S. KLARE, C. SCHNICK, B. MINTEL, K. MEYER, AND F.J. CONRATHS. 2009. Analysis of the Clonal Relationship of Serotype O26:H11 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Isolates from Cattle. *Appl Environ Microbiol* 75:6947-6953.
- GIERKE, F. AND H. KÖHLER. 2009. Tenacity, excretion and transmission of *Mycobacterium paratuberculosis* - Consequences for the control of paratuberculosis in cattle herds. *Prakt Tierarzt* 90:1169-1178.
- GLOBIG, A., A. BAUMER, S. REVILLA-FERNANDEZ, M. BEER, E. WODAK, M. FINK, N. GREBER, T.C. HARDER, H. WILKING, I. BRUNHART, D. MATTHES, U. KRAATZ, P. STRUNK, W. FIEDLER, S.R. FEREDOUNI, C. STAUBACH, F.J. CONRATHS, C. GRIOT, T.C. METTENLEITER, AND K.D.C. STARK. 2009. Ducks as Sentinels for Avian Influenza in Wild Birds. *Emerg Infect Dis* 15:1633-1636.
- GLOBIG, A., C. STAUBACH, M. BEER, U. KÖPPEN, W. FIEDLER, M. NIEBURG, H. WILKING, E. STARICK, J. P. TEIFKE, O. WERNER, F. UNGER, C. GRUND, C. WOLF, H. ROOST, F. FELDHUSEN, F. J. CONRATHS, T. C. METTENLEITER, AND T. C. HARDER. 2009. Epidemiological and Ornithological Aspects of Outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 of Asian Lineage in Wild Birds in Germany, 2006 and 2007. *Transbound Emerg Dis* 56:57-72.
- GORDON, P. M. K., E. SCHUTZ, J. BECK, H. B. URNOVITZ, C. GRAHAM, R. CLARK, S. DUDAS, S. CZUB, M. SENSEN, B. BREINIG, M. H. GROSCHUP, R. B. CHURCH, AND C. W. SENSEN. 2009. Disease-specific motifs can be identified in circulating nucleic acids from live elk and cattle infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Nucl Acids Res* 37:550-556.
- GRABHERR, H., M. SPOLDERS, M. FÜLL, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Effect of several doses of zeolite A on feed intake, energy metabolism and on mineral metabolism in dairy cows around calving. *J Anim Physiol Anim Nutr* 93:221-236.
- GRABHERR, H., M. SPOLDERS, P. LEBZIEN, L. HÜTHER, G. FLACHOWSKY, M. FÜLL, AND M. GRÜN. 2009. Effect of zeolite A on rumen fermentation and phosphorus metabolism in dairy cows. *Arch Anim Nutr* 63:321-336.
- GRABOWSKA, A. K., A. D. LIPINSKA, J. ROHDE, B. SZEWCZYK, K. BIENKOWSKA-SZEWCZYK, AND H. J. RZIHA. 2009. New baculovirus recombinants expressing Pseudorabies virus (PRV) glycoproteins protect mice against lethal challenge infection. *Vaccine* 27:3584-3591.
- GRANEVITZE, Z., J. HILLEL, M. FELDMANN, A. SIX, H. EDING, AND S. WEIGEND. 2009. Genetic structure of a wide-spectrum chicken gene pool. *Anim Genet* 40:686-693.
- GROENEVELD, E., B. VAN DER WESTHUIZEN, A. MAIWASHE, F. VOORDEWIND, AND J. B. S. FERRAZ. 2009. POPREP: A Generic Report for

- Population Management. Genet Mol Res 8:1158-1178, ISSN: 1676 5680, Eprint: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2009/vol8-3/pdf/gmr648.pdf>.
- GROENEVELD, L. F., D. W. WEISROCK, R. M. RASOLOARISON, A. D. YODER, AND P. M. KAPPELER. 2009. Species delimitation in lemurs: multiple genetic loci reveal low levels of species diversity in the genus *Cheirogaleus*. BMC Evol Biol 9, <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/9/30>.
- GROSCHUP, M. H., D. SEIDOWSKI, M. KELLER, AND U. ZIEGLER. 2009. West Nile Virus: Epizootiology, clinical assessment, diagnosis, and control. Pferdeheilkunde 25:381-382.
- GRÜN, M., M. LIEBISCH, H. SAUERWEIN, G. JAHREIS, AND K. SACHSE. 2009. Flow cytometric quantification of chlamydial infection in cell culture. J Microbiol Meth 78:360-362.
- HÄNEL, I., E. BORRMANN, J. MÜLLER, W. MÜLLER, B. PAULY, E. M. LIEBLER-TENORIO, AND F. SCHULZE. 2009. Genomic and phenotypic changes of *Campylobacter jejuni* strains after passage of the chicken gut. Vet Microbiol 136:121-129.
- HÄUSLAIGNER, R., J. SONNENBURG, S. KOTHLow, B. KASPER, C. STAUBACH, AND C. GRUND. 2009. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to study the specific humoral immune response of Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser* var. domestica) after vaccination against Newcastle disease virus. Avian Pathol 38:89-95.
- HARDER, T., C. GRUND, M. BEER, C. STAUBACH, C. SCHOENE, H. WILKING, F.J. CONRATHS, AND BL-MONITORGRUPPE. 2009. Vogelpopulationen – Brutstätten pandemischer Influenzaviren? Berl Münch Tierärztl Wschr 122:440-445.
- HARDER, T. C., J. TEUFFERT, E. STARICK, J. GETHMANN, C. GRUND, S. FEREIDOUNI, M. DURBAN, K. H. BOGNER, A. NEUBAUER-JURIC, R. REPPER, A. HLINAK, A. ENGELHARDT, A. NOCKLER, K. SMIETANKA, Z. MINTA, M. KRAMER, A. GLOBIG, T. C. METTENLEITER, F. J. CONRATHS, AND M. BEER. 2009. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) in Frozen Duck Carcasses, Germany, 2007. Emerg Infect Dis 15:272-279.
- HARDER, T.C. AND T.W. VAHLENKAMP. 2009. Influenzavirusinfektionen in dogs and cats. Vet Immunol Immunopathol [Epub ahead of print; doi: 10.1016/j.vetimm.2009.10.009]
- HAUSCHILD, T., S. STEPANOVIC, D. VUKOVIC, I. DAKIC, AND S. SCHWARZ. 2009. Occurrence of chloramphenicol resistance and corresponding resistance genes in members of the *Staphylococcus sciuri* group. Int J Antimicrob Agents 33:383-384.
- HENNING, K., H. HOTZEL, M. PETERS, P. WALTER, W. POPP, AND D. THEEGARTEN. 2009. Unanticipated outbreak of Q fever during a study using sheep, and its significance for further projects. Berl Münch Tierärztl Wschr 122:13-19.
- HERMES, R., B. BEHR, T.B. HILDEBRANDT, S. BLOTTNER, B. SIEG, A. FRENZEL, A. KNIERIEM, J. SARAGUSTY, AND D. RATH. 2009. Sperm sex-sorting in the Asian elephant (*Elephas maximus*). Anim Reprod Sci 112:390-396.
- HOCHBERGER, J., D. MENKE, K. MATTHES, W. LAMADE, AND P. KÖHLER. 2009. Transluminal interventions („NOTES“) – status quo. Dtsch Med Wschr 134:467-472.
- HÖPER, D., B. HOFFMANN, AND M. BEER. 2009. Simple, Sensitive, and Swift Sequencing of Complete H5N1 Avian Influenza Virus Genomes. J Clin Microbiol 47:674-679.
- HOFFMANN, B., B. BAUER, C. BAUER, H.J. BÄTZA, M. BEER, P.H. CLAUSEN, M. GEIER, J.M. GETHMANN, E. KIEL, G. LIEBISCH, A. LIEBISCH, H. MEHLHORN, G.A. SCHAUB, D. WERNER, AND F.J. CONRATHS. 2009. Monitoring of Putative Vectors of Bluetongue Virus Serotype 8, Germany. Emerg Infect Dis 15:1481-1484.
- HOFFMANN, B., M. BEER, S. M. REID, P. MERTENS, C. A. OURA, P. A. VAN RIJN, M. J. SLOMKA, J. BANKS, I. H. BROWN, D. J. ALEXANDER, AND D. P. KING. 2009. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. Vet Microbiol 139:1-23.
- HOFFMANN, B., M. ESCHBAUMER, AND M. BEER. 2009. Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Assays Specifically Detecting Bluetongue Virus Serotypes 1, 6, and 8. J Clin Microbiol 47:2992-2994.
- HOFFMANN, C., F. W. BAZER, J. KLUG, H. AUPPERLE, C. ELLENBERGER, AND H. A. SCHOON. 2009. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium Expression patterns for mares suffering from endometrosis. Theriogenology 71:264-274.
- HOFFMANN, C., F. W. BAZER, J. KLUG, H. AUPPERLE, C. ELLENBERGER, S. OZGEN, D. SCHOON, AND H. A. SCHOON. 2009. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Reaction patterns in the cycling mare. Pferdeheilkunde 25:212-218.
- HOFFMANN, C., C. ELLENBERGER, R. C. MATTOS, H. AUPPERLE, S. DHEIN, B. STIEF, AND H. A. SCHOON. 2009. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. Anim Reprod Sci 111:261-278.
- HOLOPAINEN, R., S. OHLEMEYER, H. SCHÜTZE, S. M. BERGMANN, AND H. TAPIOVAARA. 2009. Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. Dis Aquat Org 85:81-91.
- HONNENS, A., H. NIEMANN, K. HERZOG, V. PAUL, H. H. D. MEYER, AND H. BOLLWEIN. 2009. Relationships between ovarian blood flow and ovarian response to eCG-treatment of dairy cows. Anim Reprod Sci 113:1-10.
- HOSSEININEJAD, M., H.R. AZIZI, F. HOSSEINI, AND G. SCHARS. 2009. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. Vet Parasitol 164:315-319.
- IQBAL, K., B. BERG-KUES, S. BROLL, J. BODE, H. NIEMANN, AND W. KUES. 2009. Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. BioTechniques 47:959-967.

- JOHNE, R., A. PLENGE-BÖNIG, M. HESS, R.G. ULRICH, J. REETZ, AND A. SCHIELKE. 2009. Detection of a novel hepatitis B-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* [Epub ahead of print; doi:10.1099/vir.0.016584-0].
- JUNG, A., C. GRUND, I. MÜLLER, AND S. RAUTENSCHLEIN. 2009. Avian paramyxovirus serotype 3 infection in neopsephotus, cyanoramphus, and neophema species. *J Avian Med Surg* 23:205-208.
- KADEN, V., E. LANGE, A. HÄNEL, A. HLINAK, L. MEWES, G. HERGARTEN, B. IRSCH, J. DEDEK, AND W. BRUER. 2009. Retrospective serological survey on selected viral pathogens in wild boar populations in Germany. *Eur J Wildl Res* 55:153-159.
- KADEN, V., E. LANGE, U. NAGEL-KOHL, AND W. BRUER. 2009. Meat juice as diagnostic sample for virological and serological diagnosis of classical swine fever. *Dtsch Tierärztl Wschr* 116:173-179.
- KADLEC, K., R. EHRLICH, S. MONECKE, U. STEINACKER, H. KASPAR, J. MANKERTZ, AND S. SCHWARZ. 2009. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother* 64:1156-1164.
- KADLEC, K. AND S. SCHWARZ. 2009. Identification of a Novel Trimethoprim Resistance Gene, *dfrK*, in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Strain and Its Physical Linkage to the Tetracycline Resistance Gene *tet(L)*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:776-778.
- KADLEC, K. AND S. SCHWARZ. 2009. Novel ABC Transporter Gene, *vga(C)*, Located on a Multiresistance Plasmid from a Porcine Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Strain. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3589-3591.
- KALHORO, N. H., J. VEITS, S. RAUTENSCHLEIN, AND G. ZIMMER. 2009. A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1). *Vaccine* 27:1174-1183.
- KALTHOFF, D., A. BREITHAUPT, B. HELM, J. P. TEIFKE, AND M. BEER. 2009. Migratory status is not related to the susceptibility to HPAIV H5N1 in an insectivorous passerine species. *PLoS one* 4.
- KAMMERER, R., P. PALLUCH, K. OBOUKHOVSKIJ, M. TOELGE, T. PONGRATZ, W. BEYER, A. BUCHNER, R. BAUMGARTNER, AND W. ZIMMERMANN. 2009. The molecular basis of prostate cancer cell escape from protoporphyrin IX-based photodynamic therapy. *Med Laser Appl* 24:237-246.
- KAMPEN, H. 2009. Was macht ein Insekt zum Vektor? *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:451-457.
- KAPPE, E. C., K. KOHLER, I. V. FELBERT, J. P. TEIFKE, J. TOTH, AND M. REINACHER. 2009. Pleomorphic Corneal Sarcoma Resembling Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor in a Horse. *Vet Pathol* 46:444-448.
- KARGER, A., B. BETTIN, M. LENK, AND T.C. METTENLEITER. 2009. Rapid characterisation of cell cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric typing. *J Virol Methods* [Epub ahead of print; http://dx.doi.org/10.1016/j.viromet.2009.11.022]
- KEHRENBURG, C. A. CLOECKAERT, G. KLEIN, AND S. SCHWARZ. 2009. Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of *Salmonella* serovars other than Typhimurium: detection of novel mutations involved in modulated expression of *ramA* and *soxS*. *J Antimicrob Chemother* 64:1175-1180.
- KEHRENBURG, C., C. CUNY, B. STROMMINGER, S. SCHWARZ, AND W. WITTE. 2009. Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains of Clonal Lineages ST398 and ST9 from Swine Carry the Multidrug Resistance Gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:779-781.
- KEIL, G. M., C. KLOPFLEISCH, K. GIESOW, AND U. BLOHM. 2009. Novel vectors for simultaneous high-level dual protein expression in vertebrate and insect cells by recombinant baculoviruses. *J Virol Meth* 160:132-137.
- KELLER, C., C. ROOS, L.F. GROENEVELD, J. FISCHER, AND D. ZINNER. 2009. Introgressive Hybridization in Southern African Baboons Shapes Patterns of mtDNA Variation. *Am J Phys Anthropol* [Epub ahead of print; doi: 10.1002/ajpa.21209]
- KITTELBERGER, R., J. MARS, G. WIBBERLEY, R. STING, K. HENNING, G.W. HORNER, K.M. GARNETT, M.J. HANNAH, J.A. JENNER, C.J. PIGOTT, AND J.S. O'KEEFE. 2009. Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants: Recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *New Zeal Vet J* 57:262-268.
- KJAER, J. B. 2009. Feather Pecking in Domestic Fowl is Genetically Related to Locomotor Activity Levels: Implications for a Hyperactivity Disorder Model of Feather Pecking. *Behav Genet* 39:564-570.
- KJAER, J. B. AND D. GUEMENE. 2009. Adrenal reactivity in lines of domestic fowl selected on feather pecking behavior. *Physiol Behav* 96:370-373.
- KLAUS, C., B. HOFFMANN, U. HERING, B. MIELKE, K. SACHSE, M. BEER, AND J. SÜSS. 2009. Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin Microbiol Infect* [Epub ahead of print; doi:10.1111_j.1469-0691.2009.02764]
- KLÍMA, J., L. LACINA, B. DVORÁNKOVÁ, D. HERRMANN, J.W. CARNWATH, H. NIEMANN, H. KALTNER, S. ANDRÉ, J. MOTLÍK, H.J. GABIUS, AND K. SMETANA JR. 2009. Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. *Physiol Res* 58:873-884.
- KNOBLOCH, H., SCHROEDL, W., TURNER, C., CHAMBERS, M., AND REINHOLD, P. (2009) Electronic nose responses and acute phase proteins correlate in blood using a bovine model of respiratory infection. *Sensor Actuator B Chem* [Epub

ahead of print; doi:10.1016/j.snb.2009.10.034]

- KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E., R. ELLERICH, J. BOHME, K. CRAMER, A. DELLAVOLPE, H. MITTERER-ISTYAGIN, M. LUDEWIG, K. FEHLHABER, E. SCHUSTER, J. BERK, D. ALDEHOFF, D. FULHORST, W. KRUSE, A. DRESSEL, U. NOACK, AND T. BARTELS. 2009. Examination of rearing standards and health status in turkeys in Germany. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:271-283.
- KRAUTWALD, M., W. FUCHS, B. G. KLUPP, AND T. C. METTENLEITER. 2009. Translocation of Incoming Pseudorabies Virus Capsids to the Cell Nucleus Is Delayed in the Absence of Tegument Protein pUL37. *J Virol* 83:3389-3396.
- KREIBICH, A., J. STECH, T. C. METTENLEITER, AND O. STECH. 2009. Simultaneous one-tube full-length amplification of the NA, NP, M, and NS genes of influenza A viruses for reverse genetics. *J Virol Meth* 159:308-310.
- KRETZSCHMAR, K., S. DÄNICKE, M. SCHMUTZ, R. PREISINGER, AND S. WEIGEND. 2009. Interactions of flavin containing monooxygenase 3 (FMO3) genotype and feeding of choline and rapeseed cake on the trimethylamine (TMA) content in egg yolks of laying hens. *Arch Anim Nutr* 63:173-187.
- KRUMBHOLZ, A., M. SCHMIDTKE, S. BERGMANN, S. MOTZKE, K. BAUER, J. STECH, R. DÜRRWALD, P. WUTZLER, AND R. ZELL. 2009. High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J Gen Virol* 90:900-908.
- KUCZIUS, T., H. KARCH, AND M. H. GROSCHUP. 2009. Differential solubility of prions is associated in manifold phenotypes. *Mol Cell Neurosci* 42:226-233.
- KUES, W. A., S. SUDHEER, D. HERRMANN, J. W. CARNWATH, V. HAVLICEK, U. BESENFELDER, H. LEHRACH, J. ADJAYE, AND H. NIEMANN. 2008. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19768-19773.
- KUPAI, T., U. BAULAIN, AND A. LENGYEL. 2009. Growth modelling of different ram breeds using computer tomography. *Small Ruminant Res* 87:1-8.
- KUPFER, L., W. HINRICHS, AND M. H. GROSCHUP. 2009. Prion Protein Misfolding. *Curr Mol Med* 9:826-835.
- KUTZER, T., B. BÜNGER, J.B. KJAER, AND L. SCHRADER. 2009. Effects of early contact between non-littermate piglets and of the complexity of farrowing conditions on social behaviour and weight gain. *Appl Anim Behav Sci* 121:16-24.
- LABOURIAU, R., J.B. KJAER, G.C.G. ABREU, J. HEDEGAARD, AND A.J. BUITENHUIS. 2009. Analysis of severe feather pecking behaviour in a high feather pecking selection line. *Poultry Sci* 88:2052-2062.
- LANGE, E., D. KALTHOFF, U. BLOHM, J. P. TEIFKE, A. BREITHAUPT, C. MARESCH, E. STARICK, S. FEREDOUNI, B. HOFFMANN, T. C. METTENLEITER, M. BEER, AND T. W. VAHLENKAMP. 2009. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J Gen Virol* 90:2119-2123.
- LAROUCAU, K., B. DE BARBEYRAC, F. VORIMORE, M. CLERC, C. BERTIN, T. HARKINEZHAD, K. VERMINNEN, F. OBENICHE, I. CAPEK, C. BEBEAR, B. DURAND, G. ZANELLA, D. VANROMPAY, B. GARIN-BASTUJI, AND K. SACHSE. 2009. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. *Vet Microbiol* 135:82-89.
- LAROUCAU, K., F. VORIMORE, R. AAZIZ, A. BERNDT, E. SCHUBERT, AND K. SACHSE. 2009. Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infect Genet Evol* 9:1240-1247.
- LAROUCAU, K., F. VORIMORE, C. BERTIN, K. Y. MOHAMAD, S. THIERRY, W. HERMANN, C. MAINGOURD, C. POURCEL, D. LONGBOTTOM, S. MAGNINO, K. SACHSE, E. VRETOU, AND A. RODOLAKIS. 2009. Genotyping of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Vet Microbiol* 137:335-344.
- LEEGE, T., W. FUCHS, H. GRANZOW, M. KOPP, B. G. KLUPP, AND T. C. METTENLEITER. 2009. Effects of Simultaneous Deletion of pUL11 and Glycoprotein M on Virion Maturation of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol* 83:896-907.
- LEEGE, T., H. GRANZOW, W. FUCHS, B. G. KLUPP, AND T. C. METTENLEITER. 2009. Phenotypic similarities and differences between UL37-deleted pseudorabies virus and herpes simplex virus type. *J Gen Virol* 90:1560-1568.
- LEIFER, I., K. DEPNER, S. BLOME, M. F. LE POTIER, M. LE DIMNA, M. BEER, AND B. HOFFMANN. 2009. Differentiation of C-strain „Riems“ or CP7_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR. *J Virol Meth* 158:114-122.
- LEIFER, I., E. LANGE, I. REIMANN, S. BLOME, S. JUANOLA, J. PLANA DURAN, AND M. BEER. 2009. Modified live marker vaccine candidate CP7_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization. *Vaccine* 27:6522-6529.
- LENTZ, H., M. KASPER, AND T. SELHORST. 2009. Network analysis of the German cattle trade net - Preliminary results. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:193-198.
- LEPIKHOV, K., V. ZAKHARTCHENKO, R. HAO, F. YANG, C. WRENZYCKI, H. NIEMANN, E. WOLF, AND J. WALTER. 2008. Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics. Chromatin* 1:8.
- LIU, L. H., B. HOFFMANN, C. BAULE, M. BEER, S. BELAK, AND F. WIDEN. 2009. Two real-time RT-PCR assays of classical swine fever virus, developed for the genetic differentiation of naturally infected from vaccinated wild boars. *J Virol Meth* 159:131-133.
- LOISEL-MEYER, S., T. FELIZARDO, J. MARIOTTI, M. E. MOSSOBA, J. E. FOLEY, R. KAMMERER, N. MIZUE, R. KEEFE, J. A. MCCART, W. ZIMMERMANN, B. DROPULIC, D. H. FOWLER, AND J. A. MEDIN. 2009. Potent induction of B- and T-cell immunity against human carcinoembryonic antigen-expressing tumors in human carcinoembryonic antigen transgenic mice mediated by direct lentivector injection. *Mol Cancer Ther* 8:692-702.

- LUTTERMANN, C. AND G. MEYERS. 2009. The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA. *Genes Dev* 23:331-344.
- MA, W., D. BRENNER, Z. WANG, B. DAUBER, C. EHRHARDT, K. HÖGNER, S. HEROLD, S. LUDWIG, T. WOLFF, K. YU, J. A. RICHT, O. PLANZ AND S. PLESCHKA. 2009. The NS-segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter Replication Efficiency, cell tropism and host range of an H7N1 HPAIV. [Epub ahead of print; doi:10.1128/JVI.01668-09]
- MAKOSCHY, B., W. KLEE, V. MARTELLA, J. BRIDGER, D.G.E. SMITH, A. DAUGSCHIES, Y. MILLEMAN, E. LIEBLER-TENORIO, D. SNODGRASS, E. CLAEREBOUT, F. BENDALI, J. VAN DEN VEN, A. GARCIA, J. ILLEK, M. KASKE, K. CUTLER, J.V. GONZALEZ-MARTIN, L. MADEIRA CARVALHO, C. CROUCH, AND E. THIRY. 2009. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:404-408.
- MALERCZYK, C., T. SELHORST, N. TORDO, S. MOORE, AND T. MÜLLER. 2009. Antibodies induced by vaccination with purified chick embryo cell culture vaccine (PCECV) cross-neutralize non-classical bat lyssavirus strains. *Vaccine* 27:5320-5325.
- MANSO-SILVAN, L., E. M. VILEI, K. SACHSE, S. P. DJORDJEVIC, F. THIAUCOURT, AND J. FREY. 2009. *Mycoplasma leachii* sp nov as a new species designation for *Mycoplasma* sp bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp *capri*. *Int J System Evol Microbiol* 59:1353-1358.
- MAQUART, M., P. LE FLECHE, G. FOSTER, M. TRYLAND, F. RAMISSE, B. DJONNE, S. AL DAHOUK, I. JACQUES, H. NEUBAUER, K. WALRAVENS, J. GODFROID, A. CLOECKAERT, AND G. VERGNAUD. 2009. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol* 9.
- MARESCH, C., A. BRACKE, D. BROKER, A. KIRCHHOFF, AND J. P. TEIFKE. 2009. Coronaviruses as cause of a systemic granulomatous inflammation in a ferret (*Mustela putorius furo*). Clinical, histopathological and immunohistochemical findings. *Tierärztl Prax Kleintiere Heimtiere* 37:40-44.
- MARSHALEK, A., S. FINKE, M. SCHWEMMLE, D. MAYER, B. HEIMRICH, L. STITZ, AND K. K. CONZELMANN. 2009. Attenuation of Rabies Virus Replication and Virulence by Picornavirus Internal Ribosome Entry Site Elements. *J Virol* 83:1911-1919.
- MARSTON, D.A., L.M. McELHINNEY, Y.H. ALI, K.S. INTISAR, S.M. HO, C. FREULING, T. MÜLLER, AND A.R. FOOKS. 2009. Phylogenetic analysis of rabies viruses from Sudan provides evidence of a viral clade with a unique molecular signature. *Virus Res* 145:244-250.
- MEHLHORN, H., V. WALLDORF, S. KLIMPEL, G. SCHAUB, E. KIEL, R. FOCKE, G. LIEBISCH, A. LIEBISCH, D. WERNER, C. BAUER, H. CLAUSEN, B. BAUER, M. GEIER, T. HORBRAND, H. J. BÄTZA, F. J. CONRATHS, B. HOFFMANN, AND M. BEER. 2009. Bluetongue disease in Germany (2007-2008): monitoring of entomological aspects. *Parasitol Res* 105:313-319
- MERTENS, M., R. WÖLFEL, K. ULLRICH, K. YOSHIMATSU, J. BLUMHARDT, I. RÖMER, J. ESSER, J. SCHMIDT-CHANASIT, M. H. GROSCHUP, G. DOBLER, S. S. ESSBAUER, AND R. G. ULRICH. 2009. Seroepidemiological study in a Puumala virus outbreak area in South-East Germany. *Med Microbiol Immunol* 198:83-91.
- METHNER, U., M. HELLER, AND H. BOCKLISCH. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* in a wild boar population in Germany. *Eur J Wildl Res* [Epub ahead of print; doi:10.1007/s10344-009-0339-3].
- METTENLEITER, T. C. 2009. Animal-health facility in Germany leads the way for Europe. *Nature* 458:571.
- METTENLEITER, T. C., B. G. KLUPP, AND H. GRANZOW. 2009. Herpesvirus assembly: An update. *Virus Res* 143:222-234.
- MICHAEL, K., T. C. HARDER, T. C. METTENLEITER, AND A. KARGER. 2009. Diagnosis and strain differentiation of avian influenza viruses by restriction fragment mass analysis. *J Virol Meth* 158:63-69.
- MIKSCHOFSKY, H., M. HAMMER, J. SCHMIDTKE, P. KONIG, G. KEIL, H. SCHIRRMAYER, K. SCHMIDT, AND I. BROER. 2009. Optimization of growth performance of freshly induced carrot suspensions concerning PMP production. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 45:740-749.
- MIKSCHOFSKY, H., P. KÖNIG, G. M. KEIL, M. HAMMER, H. SCHIRRMAYER, AND I. BROER. 2009. Cholera toxin B (CTB) is functional as an adjuvant for cytoplasmatic proteins if directed to the endoplasmatic reticulum (ER), but not to the cytoplasm of plants. *Plant Sci* 177:35-42.
- MIKSCHOFSKY, H., H. SCHIRRMAYER, G. M. KEIL, B. LANGE, P. L. POLOWICK, W. KELLER, AND I. BROER. 2009. Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus. *Plant Biotechnol J* 7:537-549.
- MISCHKALE, K., I. REIMANN, J. ZEMKE, P. KÖNIG, AND M. BEER. Characterisation of a new infectious full-length cDNA clone of BVDV genotype 2 and generation of virus mutants. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.036>].
- MÖBIUS, P., I. FRITSCH, G. LUYVEN, H. HOTZEL, AND H. KÖHLER. 2009. Unique genotypes of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* strains of Type III. *Vet Microbiol* 139:398-404.
- MÖHL, B.S., S. BÖTTCHER, H. GRANZOW, J. KUHN, B.G. KLUPP, AND T.C. METTENLEITER. 2009. Intracellular Localization of the Pseudorabies Virus Large Tegument Protein pUL36. *J Virol* 83:9641-9651.
- MUCHADEYI, F. C., C. B. A. WOLLNY, H. EDING, S. WEIGEND, AND H. SIMIANER. 2009. Choice of breeding stock, preference of production traits and culling criteria of village chickens among Zimbabwe agro-ecological zones. *Trop Anim Health Prod* 41:403-412.
- MÜLLER, K., W. FUCHS, N. HEBLINSKI, J. P. TEIFKE, L. BRUNNBERG, A. D. GRUBER, AND R. KLOPFLEISCH. 2009. Encephalitis in a rabbit caused by human herpesvirus-1. *Javma-J Am Vet Med*

- Assoc 235:66–69.
- MÜLLER, T., H. J. BÄTZA, A. BECKERT, C. BUNZENTHAL, J. H. COX, C. M. FREULING, A. R. FOOKS, J. FROST, L. GEUE, A. HOEFLECHNER, D. MARSTON, A. NEUBERT, L. NEUBERT, S. REVILLA-FERNANDEZ, E. VANEK, A. VOS, E. WODAK, K. ZIMMER, AND T. C. METTENLEITER. 2009. Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. Arch Virol 154:1081–1091.
- MÜLLER, T., B. DIETZSCHOLD, H. ERTL, A.R. FOOKS, C. FREULING, C. FEHLNER-GARDINER, J. KLIEMT, F.X. MESLIN, C.E. RUPPRECHT, N. TORDO, A.I. WANDLER, AND M.P. KIENY. 2009. Development of a Mouse Monoclonal Antibody Cocktail for Post-exposure Rabies Prophylaxis in Humans. PLoS Negl Trop Dis 3:e542.
- MÜLLER, T., A. HLINAK, C. FREULING, R.U. MÜHLE, A. ENGELHARDT, A. GLOBIG, C. SCHULZE, E. STARICK, U. EGGERS, B. SASS, D. WALLSCHLÄGER, J. TEIFKE, T. HARDER, AND F.J. CONRATHS. 2009. Virological Monitoring of White Storks (*Ciconia ciconia*) for Avian Influenza. Avian Dis 31:578–584.
- MUELLER-SCHIFFMANN, A., B. PETSCH, S. R. LELIVELD, J. MUYRERS, A. SALWIERZ, C. MANGELS, S. SCHWARZINGER, D. RIESNER, L. STITZ, AND C. KORTH. 2009. Complementarity determining regions of an anti-prion protein scFv fragment orchestrate conformation specificity and antiprion activity. Mol Immunol 46:532–540.
- NEUBAUER, H. 2009. Q-Fever. Berl Münch Tierärztl Wschr 122:471–473.
- NIEHOFF, I.-D., L. HÜTHER, P. LEBZIEN, W. BIGALKE, S. DÄNICKE, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Investigations on the effect of a niacin supplementation to three diets differing in forage-to-concentrate ratio on several blood and milk variables of dairy cows. Arch Anim Nutr 63:203–218.
- NIEHOFF, I. D., L. HÜTHER, AND P. LEBZIEN. 2009. Niacin for dairy cattle: a review. Brit J Nutr 101:5–19.
- NIENHOFF, U., K. KADLEC, I. F. CHABERNY, J. VERSPOHL, G. F. GERLACH, S. SCHWARZ, D. SIMON, AND I. NOLTE. 2009. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. J Antimicrob Chemother 63:660–662.
- OROPEZA, M., B. PETERSEN, J.W. CARNWATH, A. LUCAS-HAHN, E. LEMME, P. HASSEL, D. HERRMANN, B. BARG-KUES, S. HOLLER, A.-L. QUEISSER, R. SCHWINTZER, R. HINKEL, C. KUPATT, AND H. NIEMANN. Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. Xenotransplantation 16:522–534.
- ØSTRUP, O., I. PETROVICOVA, F. STREJCEK, M. MOROVIC, A. LUCAS-HAHN, E. LEMME, B. PETERSEN, H. NIEMANN, J. LAURINCIK, AND P. MADDOX-HYTTEL. 2009. Nuclear and Nucleolar Reprogramming during the First Cell Cycle in Bovine Nuclear Transfer Embryos. Cloning and Stem Cells 11.
- PANNWITZ, G., C. WOLF, AND T. HARDER. 2009. Active Surveillance for Avian Influenza Virus Infection in Wild Birds by Analysis of Avian Fecal Samples from the Environment. J Wildl Dis 45:512–518.
- PANNWITZ, G., B. HAAS, B. HOFFMANN, AND S. FISCHER. 2009. Serological examinations for swine vesicular disease (SVD) in a closed pig breeding herd using ELISA. Berl Münch Tierärztl Wschr 122:161–168.
- PANTCHEV, A., R. STING, R. BAUERFEIND, J. TYCZKA, AND K. SACHSE. 2009. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. Comp Immunol Microbiol Infect Dis [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2009.08.002>].
- PANTCHEV, A., R. STING, R. BAUERFEIND, J. TYCZKA, AND K. SACHSE. 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. Vet J 181:145–150.
- PAVLOVA, S. P., J. VEITS, T. C. METTENLEITER, AND W. FUCHS. 2009. Live vaccination with an H5-hemagglutinin-expressing infectious laryngotracheitis virus recombinant protects chickens against different highly pathogenic avian influenza viruses of the H5 subtype. Vaccine 27:5085–5090.
- PAVLOVA, S. P., J. VEITS, G. M. KEIL, T. C. METTENLEITER, AND W. FUCHS. 2009. Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase. Vaccine 27:773–785.
- PETERS, M., J. KILWINSKI, D. RECKLING, AND K. HENNING. 2009. Epidemic mortality in greenfinches at feeder stations caused by *Trichomonas gallinae* – a recent problem in Northern Germany. Kleintierpraxis 54:433–438.
- PETERSEN, B., J. W. CARNWATH, AND H. NIEMANN. 2009. The perspectives for porcine-to-human xenografts. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 32:91–105.
- PETERSEN, B., W. RAMACKERS, A. TIEDE, A. LUCAS-HAHN, D. HERRMANN, B. BARG-KUES, W. SCHUETTLER, L. FRIEDRICH, R. SCHWINZER, M. WINKLER, AND H. NIEMANN. 2009. Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. Xenotransplantation 16:486–495.
- PITRA, C., S. SCHWARZ, AND J. FICKEL. 2009. Going west – invasion genetics of the alien raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* in Europe. Eur J Wildl Res 55 (doi: 10.1007/s10344-009-0283-2)
- PLANZ, O., S. PLESCHKA, AND T. WOLFF. 2009. Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways. Cell Microbiol 11:872–879.
- POLAK, M. P., M. LARSKA, J. P. M. LANGEVELD, A. BUSCHMANN, M. H. GROSCHUP, AND J. F. ZMUDZINSKI. 2009. Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. Vet J [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.07.032>].
- RACEDO, S. E., M. C. BRANZINI, D. SALAMONE, C. WOJCIK, V. Y. RAWE, AND H. NIEMANN. 2009. Dynamics of microtubules, motor proteins and 20S proteasomes during bovine oocyte

- IVM. *Reprod Fertil Dev* 21:304-312.
- RACEDO, S. E., C. WRENZYCKI, K. LEPIKHOV, D. SALAMONE, J. WALTER, AND H. NIEMANN. 2009. Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte *in vitro* maturation. *Reprod Fertil Dev* 21:738-748.
- RAGALLER, V., L. HUTHER, AND P. LEBZIEN. 2009. Folic acid in ruminant nutrition: a review. *Brit J Nutr* 101:153-164.
- RAO, K., J. XIE, X. YANG, L. CHEN, R. GROSSMANN, AND R. ZHAO. 2009. Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with alterations in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. *Brit J Nutr* 102:848-857.
- RASMUSSEN, T. B., I. REIMANN, A. UTTENTHAL, I. LEIFER, K. DEPNER, H. SCHIRRMAYER, AND M. BEER. Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.037>].
- RATH, D., R. BATHGATE, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. ROCA, J. STRZEZEK, AND D. WABERSKI. 2009. Recent advances in boar semen cryopreservation. *Soc Reprod Fertil* 66 (Suppl):51-66.
- RATH, D., G. MOENCH-TEGEDER, U. TAYLOR, AND L. A. JOHNSON. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71:22-29.
- REBL, A., T. GOLDAMMER, U. FISCHER, B. KÖLLNER, AND H. M. SEYFERT. 2009. Characterization of two key molecules of teleost innate immunity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): MyD88 and SAA. *Vet Immunol Immunopathol* 131:122-126.
- REBL, A., B. KÖLLNER, E. ANDERS, K. WIMMERS, AND T. GOLDAMMER. 2009. Peptidylarginine deiminase gene is differentially expressed in freshwater and brackish water rainbow trout. *Mol Biol Rep* [Epub ahead of print; 10.1007/s11033-009-9738-5].
- REIMANN, I., K. DEPNER, K. UTKE, I. LEIFER, E. LANGE, AND M. BEER. 2009. Characterization of a new chimeric marker vaccine candidate with a mutated antigenic E2-epitope. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.042>].
- REINHOLD, P., H. HARTMANN, AND P. D. CONSTABLE. 2009. Characterisation of acid-base abnormalities in pigs experimentally infected with *Chlamydia suis*. *Vet J* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.02.005>].
- RICHTER, A., H.M. HAFEZ, A. BÖTTNER, A. GANGL, K. HARTMANN, M. KASKE, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, G. LUHOFER, B. SCHULTZ, S. SCHWARZ, C. SIGGE, K.H. WALDMANN, J. WALLMANN, AND C. WERCKENTHIN. 2009. Verabreichung von Antibiotika in Geflügelbeständen. *Tierärztl Prax Großtiere* 37(G):321-329.
- SACHSE, K., K. LAROUCAU, F. VORIMORE, S. MAGNINO, J. FEIGE, W. MULLER, S. KUBE, H. HOTZEL, E. SCHUBERT, P. SLICKERS, AND R. EHRRICHT. 2009. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet Microbiol* 135:22-30.
- SACHSE, K., D. LONGBOTTOM, AND A. POSPISCHIL. 2009. Chlamydioses Preface. *Vet Microbiol* 135:1.
- SACHSE, K., H. S. H. SALAM, R. DILLER, E. SCHUBERT, B. HOFFMANN, AND H. HOTZEL. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet J* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.10.008>].
- SACHSE, K., E. VRETOU, M. LIVINGSTONE, N. BOREL, A. POSPISCHIL, AND D. LONGBOTTOM. 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol* 135:2-21.
- SCHARES, G., W. BASSO, M. MAJZOU, H. C. CORTES, A. ROSTAHER, J. SELMAIR, W. HERMANN, F. J. CONRATHS, AND N. S. GOLLNICK. 2009. First *in vitro* isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Vet Parasitol* 163:315-322.
- SCHARES, G., H. WILKING, M. BOLLN, F. J. CONRATHS, AND C. BAUER. 2009. *Neospora caninum* in dairy herds in Schleswig-Holstein, Germany. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:47-50.
- SCHIERACK, P., K. KADLEC, S. GUENTHER, M. FILTER, S. SCHWARZ, C. EWERS, AND L.H. WIELER. 2009. Antimicrobial resistances do not affect colonization parameters of intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Gut Pathogens* 1:18.
- SCHLEGEL, M., S.S. ESSBAUER, M. MERTENS, M.H. GROSCHUP, J. SCHMIDT-CHANASIT, J. FREISE, W. WEGENER, AND R.G. ULRICH. 2009. Longitudinal studies on Puumala virus prevalence in bank voles from two endemic regions in Germany. *Mamm Biol* 74S:22-23.
- SCHLEGEL, M., B. KLEMPA, B. AUSTE, M. BEMMANN, J. SCHMIDT-CHANASIT, T. BÜCHNER, M.H. GROSCHUP, M. MEIER, A. BALKEMA-BUSCHMANN, H. ZOLLER, D.H. KRÜGER, AND R.G. ULRICH. 2009. Dobrava-Belgrade Virus Spillover Infections, Germany. *Emerg Infect Dis* 15:2017-2020.
- SCHMIDT-CHANASIT, J., A. BIALONSKI, P. HEINEMANN, R. G. ULRICH, S. GÜNTHER, H. F. RABENAU, AND H. W. DOERR. 2009. A 10-year molecular survey of herpes simplex virus type 1 in Germany demonstrates a stable and high prevalence of genotypes A and B. *J Clin Virol* 44:235-237.
- SCHMIDT-CHANASIT, J., S. ÖLSCHLÄGER, A. BIALONSKI, P. HEINEMANN, K. BLEYMEHL, G. GROSS, S. GÜNTHER, R.G. ULRICH, AND H.W. DOERR. Novel approach to differentiate subclades of varicella-zoster virus genotypes E1 and E2 in Germany. *Virus Res* 145:347-349.
- SCHMOOCK, G., R. EHRRICHT, F. MELZER, A. RASSBACH, H. C. SCHOLZ, H. NEUBAUER, K. SACHSE, R. A. MOTA, M. SAQIB, AND M. ELSCHNER. 2009. DNA microarray-based detection and identification of *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia* spp. *Mol Cell Probes* 23:178-187.
- SCHOENE, C., T. HARDER, A. GLOBIG, M. BEER, F. J. CONRATHS, AND T. C. METTENLEITER. 2009. The wild bird enigma: what role do wild birds play in the highly pathogenic avian influenza

- epizootic? Tierärztl Umschau 64:77-83.
- SCHÖNE, F., M. LEITERER, P. LEBZIEN, D. BEMMANN, M. SPOLDERS, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Iodine concentration of milk in a dose-response study with dairy cows and implications for consumer iodine intake. *J Trace Elem Med Biol* 23:84-92.
- SCHOLTZ, N., I. HALLE, G. FLACHOWSKY, AND H. SAUERWEIN. 2009. Serum chemistry reference values in adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) including sex-related differences. *Poultry Sci* 88:1186-1190.
- SCHOLZ, A. M. AND U. BAULAIN. 2009. Methods for determination of body composition in living animals. *Züchtungskunde* 81:86-96.
- SCHOLZ, B., S. RÖNCHEN, H. HAMANN, AND O. DISTL. 2009. Bone strength and keel bone status of two layer strains kept in small group housing stems with different perch configurations and group sizes. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:249-256.
- SCHOLZ, H.C., E. HOFER, G. VERGNAUD, P. LE FLECHE, A.M. WHATMORE, S. AL DAHOUK, M. PFEFFER, M. KRÜGER, A. CLOECKAERT, AND H. TOMASO. 2009. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector-Borne & Zoonotic Dis* 9:153-156.
- SCHOLZ, H.C., K. NÖCKLER, C. GÖLLNER, P. BAHN, G. VERGNAUD, H. TOMASO, S. AL DAHOUK, P. KÄMPFER, A. CLOECKAERT, M. MAQUART, M.S. ZYGMUNT, A.M. WHATMORE, M. PFEFFER, B. HUBER, H.J. BUSSE, AND K. DE BARUN. 2009. *Brucella inopinata* sp. nov. Isolated from a breast implant infection. *Int J System Evol Microbiol* [Epub ahead of print; doi:10.1099/ijs.0.011148-0]
- SCHRADER, L. 2009. Tierschutz und Tierhaltung in der Milchviehhaltung. *Züchtungskunde* 81:414-420.
- SCHRADER, L., K. FUHRER, AND S. PETOW. 2009. Body temperature of ostriches (*Struthio camelus*) kept in an open stable during winter time in Germany. *J Therm Biol* 34:366-371.
- SCHRADER, L., AND B. MÜLLER. 2009. Night-time roosting in the domestic fowl: The height matters. *Appl Anim Behav Sci* 121:179-183.
- SCHREY, C., L. MUNDHENK, A. GRUBER, K. HENNING, AND C. FREY. 2009. *Trichostrongylus axei* als Durchfallerreger bei drei Katzen. *Kleintierpraxis* 54:93-96.
- SCHROER, D., J. VEITS, C. GRUND, M. DAUBER, G. KEIL, H. GRANZOW, T. C. METTENLEITER, AND A. RÖMER-OBERDORFER. 2009. Vaccination with Newcastle Disease Virus Vectored Vaccine Protects Chickens Against Highly Pathogenic H7 Avian Influenza Virus. *Avian Dis* 53:190-197.
- SCHULZE ZUR WIESCH, J., D. WICHMANN, I. SOBOTKA, H. ROHDE, G. SCHMOOCK, R. WERNERY, S. SCHMIEDEL, D. BURCHARD, AND F. MELZER. 2009. Genomic Tandem Repeat Analysis Proves Laboratory-Acquired Brucellosis in Veterinary (Camel) Diagnostic Laboratory in the United Arab Emirates. *Zoon Publ Health* [Epub ahead of print; doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01258.x].
- SCHUMANN, T., H. HOTZEL, P. OTTO, AND R. JOHNE. 2009. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology* 386:334-343.
- SCHUMANN, B., P. LEBZIEN, K.-H. UEBERSCHÄR, AND S. DÄNICKE. 2009. Effects of the level of feed intake and ergot contaminated concentrate on ergot alkaloid metabolism and carry over into milk. *Mol Nutr Food Res* 53:931-938.
- SCHWARZ, A., W. A. MAIER, T. KITEMANN, AND H. KAMPEN. 2009. Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (*Acarini: Ixodidae*) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *Int J Hyg Environ Health* 212:87-96.
- SCHWARZ, S. 2009. Aktuelle Daten zur Empfindlichkeitslage animaler Staphylokokken in Deutschland. *Chemother J* 18:6-12.
- SCHWARZ, S. 2009. GERMAP 2008-Resistance monitoring in Germany: antibiotic use and occurrence of resistance in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 32:51-52.
- SENDER, V., N. HOFMEISTER-MIELKE, K. SIEVERT, J. P. TEIFKE, H. VOGEL, J. BAUMGART, U. PICHLMEIER, M. FREUND, J. CASPER, AND D. WOLFF. 2009. Preclinical analysis of treosulfan in combination with total body irradiation as conditioning regimen prior to bone marrow transplantation in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 31:595-600.
- SETIADI, MA., M. TRUMPA, D. RATH, AND B. MEINECKE. 2009. Elevated histone H1 (MPF) and mitogen-activated protein kinase activities in pig oocytes following *in vitro* maturation do not indicate cytoplasmic maturation. *Reprod Dom Anim* 44:235-240.
- SIGURDSON, C. J., K. P. R. NILSSON, S. HORNEMANN, M. HEIKENWALDER, G. MANCO, P. SCHWARZ, D. OTT, T. RULICKE, P. P. LIBERSKI, C. JULIUS, J. FALSIG, L. STITZ, K. WUTHRICH, AND A. AGUZZI. 2009. *De novo* generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:304-309.
- SIROTKIN, A.V., D. OVCHARENKO, R. GROSSMANN, M. LAUKOVA, AND M. MLYNCEK. 2009. Identification of MicroRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol* 219:415-420.
- SÖRGE, S.C., M. MÜLLER, G. SCHARS, E. GROSSMANN, T. NEUSS, H. PUCHTA, P. KREUZER, T. EWINGMANN, J. EHRLEIN, K.H. BOGNER, AND W. SCHMAHL. 2009. Beteiligung von *Neospora caninum* bei Rinderaborten in Nordbayern. *Tierärztl Umschau* 64:235-243.
- SPEKKER, K., M. CZESLA, V. INCE, K. HESELER, S.K. SCHMIDT, G. SCHARS, AND W. DAUBENER. 2009. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Involved in Defense against *Neospora caninum* in Human and Bovine Cells. *Infect Immun* 77:4496-4501.
- SPOLDERS, M., S. ÖHLSCHLAGER, J. REHAGE, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Inter- and intra-individual differences in serum copper and zinc concentrations after feeding different amounts of copper and zinc over two lactations. *J Anim Physiol Anim Nutr* [Epub ahead of print; doi: 10.1111/j.1439-0396.2008.00895.x].
- SPRAGUE, L. D., E. SCHUBERT, H. HOTZEL, S. SCHARF, AND K. SACHSE. 2009. The detection of *Chlamydophila psittaci* genotype

- C infection in dogs. *Vet J* 181:274-279.
- SPRAGUE, L. D., R. ZACHARIAH, H. NEUBAUER, R. WERNERY, M. JOSEPH, H. C. SCHOLZ, AND U. WERNERY. 2009. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. *BMC Vet Res* 5.
- STÄHL, K., M. BEER, H. SCHIRRMIEIER, B. HOFFMANN, S. BELÁK, AND S. ALENIUS. 2009. Atypical ‚HoBi‘-like pestiviruses – Recent findings and implications thereof. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.048>].
- STECH, O., J. VEITS, S. WEBER, D. DECKERS, D. SCHROER, T. W. VAHLENKAMP, A. BREITHAUPT, J. TEIFKE, T. C. METTENLEITER, AND J. STECH. 2009. Acquisition of a Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site by a Low-Pathogenic Avian Influenza Virus Is Not Sufficient for Immediate Transformation into a Highly Pathogenic Strain. *J Virol* 83:5864-5868.
- STÖCKEL, S., S. MEISEL, R. BÖHME, M. ELSCHNER, P. RÖSCH, AND J. POPP. 2009. Effect of supplementary manganese on the sporulation of *Bacillus* endospores analysed by Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 40:1469-1477.
- SÜSS, J. 2009. Ticks – TBE – Climate change: do we have reliable data? *Berl Münch Tierärztl Wschr* 122:481-482.
- TAYLOR, U., H. J. SCHUBERTH, D. RATH, H. W. MICHELMANN, C. SAUTER-LOUIS, AND H. ZERBE. 2009. Influence of Inseminate Components on Porcine Leucocyte Migration *In Vitro* and *In Vivo* after Pre- and Post-Ovulatory Insemination. *Reprod Dom Anim* 44:180-188.
- TAYLOR, U., H. ZERBE, H. M. SEYFERT, D. RATH, U. BAULAIN, K. F. A. LANGNER, AND H. J. SCHUBERTH. 2009. Porcine spermatozoa inhibit post-breeding cytokine induction in uterine epithelial cells *in vivo*. *Anim Reprod Sci* 115:279-289.
- TEWS, B. A., E. M. SCHÜRSMANN, AND G. MEYERS. 2009. Mutation of Cysteine 171 of Pestivirus E-rns RNase Prevents Homodimer Formation and Leads to Attenuation of Classical Swine Fever Virus. *J Virol* 83:4823-4834.
- THOMA, B., E. STRAUBE, H. C. SCHOLZ, S. AL DAHOUK, L. ZOLLER, M. PFEFFER, H. NEUBAUER, AND H. TOMASO. 2009. Identification and antimicrobial susceptibilities of *Ochrobactrum* spp. *Int J Med Microbiol* 299:209-220.
- THULKE, H.-H., D. EISINGER, C. FREULING, A. FRÖHLICH, A. GLOBIG, V. GRIMM, T. MÜLLER, T. SELHORST, C. STAUBACH, AND S. ZIPS. 2009. Situation-based surveillance: adapting investigations to actual epidemic situations. *J Wildl Dis* 45:1089-1103.
- TIPPMANN, F., J. HUNDT, A. SCHNEIDER, K. ENDRES, AND F. FAHRENHOLZ. 2009. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *Faseb J* 23:1643-1654.
- TROJNAR, E., P. OTTO, AND R. JOHNE. 2009. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. *Virology* 386:325-333.
- TZSCHENTKE, B., AND I. HALLE. 2009. Influence of temperature stimulation during the last 4 days of incubation on secondary sex ratio and later performance in male and female broiler chicks. *Br Poultry Sci* 50:634-640.
- UN, H., N. JOHNSON, A. VOS, T. MÜLLER, A.R. FOOKS, AND O. AYLAN. 2009. Genetic analysis of four human rabies cases reported in Turkey between 2002 and 2006. *Clin Microbiol Infect* 15:1185-1189.
- VACCARI, G., C.H. PANAGIOTIDIS, C. ACIN, S. PELETTI, F. BARILLET, P. ACUTIS, A. BOSSERS, J. LANGEVELD, L. VAN KEULEN, T. SKLAVIADIS, J.J. BADIOLA, O. ANDREOLETTI, M.H. GROSCUP, U. AGRIMI, J. FOSTER, AND W. GOLDMANN. 2009. State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet Res* 40:48.
- VELAZQUEZ, M. A., J. ZARAZA, A. OROPEZA, R. WEBB, AND H. NIEMANN. 2009. The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction* 137:161-180.
- VELAZQUEZ, M. A., I. PARRILLA, A. VAN SOOM, S. VERBERCKMOES, W. KUES, AND H. NIEMANN. 2009. Sampling techniques for oviductal and uterine luminal fluid in cattle. *Theriogenology* [Epub ahead of print; doi: dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.004].
- VON BORELL, E., B. BUNGER, T. SCHMIDT, AND T. HORN. 2009. Vocal-type classification as a tool to identify stress in piglets under on-farm conditions. *Animal Welfare* 18:407-416.
- VOS, A., C. FREULING, S. ESKIIZMIRLILER, H. UN, O. AYLAN, N. JOHNSON, S. GURBUZ, W. MÜLLER, N. AKKOCA, T. MÜLLER, A.R. FOOKS, AND H. ASKAROGLU. 2009. Rabies in Foxes, Aegean Region, Turkey. *Emerg Infect Dis* 15:1620-1622.
- WEGELT, A., I. REIMANN, J. ZEMKE, AND M. BEER. 2009. New insights into processing of bovine viral diarrhea virus glycoproteins E-rns and E1. *J Gen Virol* 90:2462-2467.
- WEIDMANN, M., F. HUFERT, M. ELSCHNER, N. SILMAN, A. MIRAZIMI, F. MOREJÓN DE GIRÓN, AND P. BUTAYE. 2009. Networking for BSL-3/4 laboratory scientist training. *Nature Rev Microbiol* 7:756.
- WEIGEND, S., K. STRICKER, AND F.-G. RÖHRSEN. 2009. Establishing a conservation flock for „Vorwerkhuhn“ chicken breed – a case study of *in-situ* conservation of local chicken breeds in Germany. *Anim Genet Res Inf* 44:87-88.
- WILKING, H., M. ZILLER, C. STAUBACH, A. GLOBIG, T.C. HARDER, AND F.J. CONRATHS. 2009. Chances and Limitations of Wild Bird Monitoring for the Avian Influenza Virus H5N1 – Detection of Pathogens Highly Mobile in Time and Space. *PLoS one* 4:e6639.
- XIONG, X. P., J. M. BOYETT, R. G. WEBSTER, AND J. STECH. 2009. A stochastic model for estimation of mutation rates in multiple-replication proliferation processes. *J Math Biol* 59:175-191.
- YEN, M. W. S., O. LISANTI, F. THIBAUT, T. S. SAN, L. G. KEE, V. HILAIRE, L. JIALI, H. NEUBAUER, G. VERGNAUD, AND V. RAMISSE. 2009. Validation of ten new polymorphic tandem repeat loci

and application to the MLVA typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in Singapore from 1988 to 2004. *J Microbiol Meth* 77:297-301.

YUAN, L., Y. NI, S. BARTH, Y. WANG, R. GROSSMANN, AND R. ZHAO. 2009. Layer and broiler chicks exhibit similar hypothalamic expression of orexigenic neuropeptides but distinct expression of genes related to energy homeostasis and obesity. *Brain Res* 1273:18-28.

ZAJAC, M. P. D., S. A. ROMERA, M. F. LADELFA, F. KOTSIAS, J. THIRY, D. ZIANT, F. MEURENS, G. M. KEIL, E. THIRY, AND B. MUYLKENS. 2009. Characterization of interspecific recombinants generated from closely related bovine herpesviruses 1 and 5 through multiple PCR sequencing assays. *J Virol Meth* 161:75-83.

ZEMKE, J., P. KÖNIG, K. MISCHKALE, I. REIMANN, AND M. BEER. 2009. Novel BVDV-2 mutants as new candidates for modified-live vaccines. *Vet Microbiol* [Epub ahead of print; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.045>].

ZINNER, D., L. F. GROENEVELD, C. KELLER, AND C. ROOS. 2009. Mitochondrial phylogeography of baboons (*Papio* spp.) - Indication for introgressive hybridization? *BMC Evol Biol* 9.

ZWEIFEL, D., R. HOOP, K. SACHSE, A. POSPISCHIL, AND N. BOREL. 2009. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in wild birds - potential risk for domestic poultry, pet birds, and public health? *Eur J Wildl Dis* 55:575-581.

angewandte Forschung 01./02.04.09, S. 172-175.

BERK, J. 2009. Effekte der Einstreuart auf die Entwicklung von Pododermatitis bei männlichen Broilern. *REKASAN-Journal* 16:111-113.

BERK, J. 2009. Effekte der Einstreuart auf Tiergesundheit und Tierleistungen bei Putenhennen. In: Rahmann, G. und U. Schumacher (Hrsg.) Neues aus der ökologischen Tierhaltung 2009. *Landbauforschung Sonderheft* 332, S. 23-29.

BERK, J. 2009. Sloweniens Geflügelhalter rüsten sich. *DGS Magazin* 49/2009:30-34.

BERK, J. 2009. Bessere Fußballen, weniger Arbeit. *Land & Forst* 25:32-35.

BILK, S., A. ENGELHARDT, N. MATTHES, C. SCHULZE, U. MÜHLE, T. MÜLLER, T. HARDER, AND A. HLINAK. 2009. Aviäre Influenza A: Untersuchungen im Rahmen des Wildvogelmonitorings im Land Brandenburg. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 34:115-125.

BOCKLISCH, H., U. KÜCKEN, L. HOFFMANN, W. MÜLLER, AND P. OTTO. 2009. Hasenerkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der Tularämie in Thüringen. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 34:417-421.

BRADÉ, V. W., P. LEBZIEN, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Use of the milk urea content in feeding advice and as an indicator of the N excretion in milk production - An overview. *Ber ü Landw* 87:31-42.

CONRATHS, F.J., B. HOFFMANN, B. BAUER, C. BAUER, H.-J. BÄTZA, M. BEER, P.-H. CLAUSEN, M. GEIER, J.M. GETHMANN, E. KIEL, G. LIEBISCH, A. LIEBISCH, H. MEHLHORN, G.A. SCHAUB, AND D. WERNER. 2009. *Culicoides obsoletus* sensu stricto wichtiger Vektor für Blauzungenkrankheit in Deutschland. *Vet-MedReport VS* 33:6.

DÄMMGEN, U., H.D. HÄNEL, C. ROSEMAN, N.J. HUTCHINGS, W. BRADÉ, AND P. LEBZIEN. 2009. Improved national calculation procedures to assess energy requirements, nitrogen and VS excretions of dairy cows in the German emission model GAS-EM. *Landbauforschung Volkenrode* 59:233-252.

DÄNICKE, S. 2009. Mykotoxine als unerwünschte Stoffe in der Tierernährung. *Schriftenreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich*, Bd. 32, Tagung vom 02.-04.09.2009 in Kartause-Ittingen, Schweiz, S. 11-22.

DÖLL, S., J. SCHRINCKX, J. FINK-GREMMELS, AND S. DÄNICKE. 2009. Effects of feeding diets containing practically relevant concentrations of DON on the expression of inflammation related genes in pigs. *Schriftenreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich*, Bd. 32, Tagung vom 02.-04.09.2009 in Kartause-Ittingen, Schweiz, S. 232-233.

ESSBAUER, S., S. SCHEX, W. SPLETTSTOESSER, M. PFEFFER, R. G. ULRICH, E. SEIBOLD, G. DOBLER, R. WÖLFEL, AND W. BÄUMLER. 2009. Nagetier-

2.2 VERÖFFENTLICHUNGEN IN NICHT REFERIERTEN ZEITSCHRIFTEN/CONFERENCE PROCEEDINGS

AUSSCHUSS FÜR BEDARFSNORMEN DER GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNGS-PHYSIOLOGIE. 2009. Communications of the Committee for Requirement Standards of the Society of Nutrition Physiology - New Equations for Predicting Metabolisable Energy of Compound Feeds for Cattle. *Proc Soc Nutr Physiol* 18:143-146.

BERGMANN, S.M., H. SCHÜTZE, U. FISCHER, D. FICHTNER, M. RIECHARDT, K. MEYER, D. SCHRUDDE, AND J. KEMPTER. Detection of koï herpes virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 29:145-152.

BERGSCHMIDT, A., AND L. SCHRADER. 2009. Application of an animal welfare assessment system for policy evaluation: Does the Farm Investment Scheme improve animal welfare in subsidised new stables? *Landbauforschung Volkenrode* 59:95-103.

BERK, A. 2009. Untersuchungen zum Einsatz von NSP-spaltenden Enzymen in der Ferkelfütterung. *Forum*

- übertragene Zoonosen: Beispiele aus Untersuchungen in Süd- und Westdeutschland. In: Wirbeltierforschung in der Kulturlandschaft – Grundlagen und Anwendung, Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut 421:37-92.
- FLACHOWSKY, G. 2009. Zur ernährungsphysiologischen Bewertung von Futtermitteln aus gentechnisch veränderten Pflanzen (GMP). Symposium am 09.10.2009 in Hohenheim „Futtermittel in der food chain – Innovation in Analytik und Bewertung“, S. 21-33.
- FLACHOWSKY, G. 2009. Die Ernährung heute und in Zukunft – Was können wir uns (noch) leisten? 600-Jahrfeier der Universität Leipzig, 05.06.09, S. 57-78.
- FLACHOWSKY, G. 2009. CO₂-Footprints für Lebensmittel tierischer Herkunft – Wo stehen wir? Schriftenreihe der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät Kiel, Heft 114, S. 49-67.
- FLACHOWSKY, G. 2009. Konzentrationen und Transfer „erwünschter“ Futterinhaltsstoffe in Lebensmittel tierischer Herkunft – Was können wir uns (noch) leisten? Mühle + Mischfutter 146:771-776.
- FLACHOWSKY, G., AND P. LEBZIEN. 2009. Klimaschonende Erzeugung von Fleisch und Milch. Mais 3/2009, S. 87-90.
- FLACHOWSKY, G., U. MEYER, AND W. BRADE. 2009. Warum benötigen wir "CO₂-Fußabdrücke" (Footprints) für Lebensmittel tierischer Herkunft? REKASAN-Journal 16 (31/32):46-50.
- FLACHOWSKY, G., AND M. RODEHUTSCORD. 2009. Zur Verbesserung der Phosphor-Effizienz in der Tierproduktion. REKASAN-Journal 16 (31/32):33-36.
- FLACHOWSKY, G. 2009. How do we receive CO₂ footprints for food of animal origin? Archiv für Tierzucht 51 (Suppl.):67-82.
- FOEGEL-NIESMANN, G., C. STAUBACH, S. BLOME, AND V. MOENNIG. 2009. Assessment of international inter-laboratory comparison tests for the diagnosis of Classical Swine Fever from 1998 until 2007. OIE Sci Tech Rev 28:3 (in press).
- GRABOW, M., U. MEYER, H. JANSSEN, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Untersuchungen zur Wasseraufnahme von Aufzuchttrindern. Forum angewandte Forschung 01./02.04.09, S. 50-53.
- HACHENBERG, S., G. FLACHOWSKY, AND S. DÄNICKE. 2009. CO₂-footprints for food of animal origin – potentials and pitfalls. Schriftenreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich, Bd. 32, Tagung vom 02.-04.09.2009 in Kartause-Ittingen, Schweiz, S. 232-233.
- HALLE, I., P. JANCZYK, G. FREYER, AND W.B. SOUFFRANT. 2009. Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on laying hen performance. Archiva Zootechnica 12:5-13.
- HALLE, I., AND B. TZSCHENTKE. 2009. Ein Grad mehr kann viel bewirken. DGS-Magazin 31/2009, S. 28-32.
- HEIL, G. AND L. DEMPFLÉ. 2009. Genetic differences in the development of aggressive behaviour of male domestic rabbits at the age of 8 – 30 weeks. Lohmann Information 44:43-60.
- HOCHBERGER, J., S. DAMMER, E. KRUSE, D. MENKE, P. KÖHLER, J. RAISER, AND M. ENDERLE. 2009. Endoskopische Submukosa-Dissektion – technische Voraussetzungen. Verdauungskrankheiten 27:260-268.
- HOCHBERGER, J., E. KRUSE, P. KÖHLER, K. BÜRRIG, AND D. MENKE. 2009. Diagnostische und interventionelle Endoskopie in der Gastroenterologie – Von „High-resolution-Chips“ über endoskopische Resektionsverfahren zu NOTES. HNO 57:1237-1252.
- HOCHBERGER, J., D. MENKE, P. KÖHLER, AND W. LAMADÉ. 2009. NOTES – Internationaler Stand. Viszeralmedizin 25:157-162.
- HÖRETH-BÖNTGEN, D., F.J. CONRATHS, AND T.C. METTENLEITER. 2009. Drohen neue Gefahren für die Tierwelt? VDL-Journal 4/2009, 4-6.
- JEROCH, H., J.G. BRETTSCHEIDER, S. DÄNICKE, J. JANKOWSKI, K. KOZLOWSKI, AND F. SCHOENE. 2009. The effect of chemically and hydrothermally treated rapeseed on the performance and thyroid parameters of layers. Pol J Vet Sci 12:439-448.
- JOHNSON, N., H. UN, A. R. FOOKS, C. FREULING, T. MÜLLER, O. AYLAN, AND A. VOS. Rabies epidemiology and control in Turkey: past and present. Epidemiol Infect [Epub ahead of print; doi:10.1017/S0950268809990963].
- KAMPEN, H. 2009. How to become a vector. Mitt Dt Ges Allg Angew Ent 17:331-335.
- KEMPTER, J., J. SADOWSKI, H. SCHÜTZE, U. FISCHER, M. DAUBER, D. FICHTNER, R. PANICZ, AND S.M. BERGMANN. 2009. Koi herpes virus: do acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones? Acta Ichthyol Piscat 39:119-126.
- KIESEWETTER, H., S. LUDWIG, AND O. PLANZ. 2009. Cistus incanus extract: Current research on the antiviral activity of Cystus052. DAZ 149:44-47.
- KNOBLOCH, H., H. KÖHLER, N. COMMANDER, P. REINHOLD, C. TURNER, AND M. CHAMBERS. 2009. Volatile Organic Compound (VOC) Analysis For Disease Detection: Proof of Principle For Field Studies Detecting Paratuberculosis And Brucellosis. In: M. Pardo and G. Sberveglieri (Hrsg.) Olfaction and Electronic Nose: Proceedings of the 13th International Symposium, American Institute of Physics, ISBN: 978-0-7354-0674, S. 195-197.
- KNOBLOCH, H., C. TURNER, M. CHAMBERS, AND P. REINHOLD. Serum Headspace Analysis With An Electronic Nose And Comparison With Clinical Signs Following Experimental Infection Of Cattle With *Mannheimia Haemolytica*. In: M. Pardo and G. Sberveglieri (Hrsg.) Olfaction and Electronic Nose: Proceedings of the 13th International Symposium, American Institute of Physics, ISBN: 978-0-7354-0674, S. 439-442.

- KUTZER, T. AND B. BÜNGER. 2009. Ferkelaufzucht: Früh mit den Nachbarn spielen. DGS Magazin 23/2009:49-52.
- KUTZER, T., B. BÜNGER, J. KJAER AND L. SCHRADER. 2009. Ein Ferkelschupf in Einzelabferkelungssystemen – Kontaktmöglichkeit für wurffremde Ferkel. In: KTBL Tagungsband: 9. Tagung: Bau, Technik und Umwelt in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung 2009, 21.-23. Sept. 2009, Berlin, S. 143-148.
- LEBZIEN, P., U. MEYER, AND S. HACHENBERG. 2009. Strategien zur Minderung von klimarelevanten Emissionen und N-Ausscheidungen aus der Tierproduktion. Tagung aktiver Klimaschutz und Anpassung an den Klimawandel, 15.-16.06.09, Braunschweig, S. 31-33.
- LEBZIEN, P., I.-D. NIEHOFF, L. HÜTHER, W. BIGALKE, S. DÄNICKE, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Effects of a niacin supplementation to different diets on rumen fermentation, amounts of niacin at the duodenum and its concentration in blood and milk of dairy cows. XIth International Symposium on Ruminant Physiology, Clermont-Ferrand, France, 6.-9.09.09, S. 86-87.
- METTENLEITER, T. C. AND W. W. BOEHLE. 2009. Infectious diseases in a changing environment. Arch Tierzucht 51 (Suppl.):49-56.
- METTENLEITER, T.C., AND T. MÜLLER. 2009. Eradication of Aujeszky's Disease – the German experience. Magazin Weterynaryjny (Suppl.), 566-570.
- MEYER, A., AND P. KÖHLER. 2009. Weicher Speck durch den Einsatz von Körnermais? DGS Magazin 23/2009:54.
- MEYER, U., M. GRABOW, W. STAHL, M. EVERINGHOFF, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Untersuchungen zur Wasseraufnahme von Aufzuchttrindern, Mastbullen und Milchkühen. Schriftenreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich, Bd. 32, Tagung vom 02.-04.09.2009 in Kartause-Ittingen, Schweiz, S. 258-259.
- MEYER, U., L. HÜTHER, R. MANDERSCHIED, H.-J. WEIGEL, M. LOHÖLTER, AND A. SCHENDERLEIN. 2009. A.: Ernährungsphysiologische Bewertung von „Mais 2050“. Landbauforsch SH 331:107-113.
- MOSER, I. 2009. Kehrt die Tuberkulose zurück? Top Agrar R18-R19.
- MOSER, I. 2009. Tuberkulose beim Rind – eine neue alte Gefahr? Aktueller Stand. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 2/2009:68-72.
- MÜHLE, R.U., T. MÜLLER, M. KRAMER, C. FREULING, S. BILK, U. EGGERS, D. WALLSCHLÄGER, T. HARDER, F.J. CONRATHS, AND A. HLINAK. 2009. Bedeutung des Rückganges von Rastplätzen für die Verbreitung von aviären Infektionen bei Zugvögeln am Beispiel des Ramsar-Gebietes Untere Havelniederung. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 34:127-137.
- MÜLLER, W., P. OTTO, AND H. TOMASO. 2009. Hasenpest: Jäger aufgepasst! Natur und Jagd. Landwirtschaftl Wochenbl 41:41-42.
- NIEMANN, H., S. DÄNICKE, F.J. CONRATHS, AND L. SCHRADER. 2009. Tierzucht und Tierhaltung: Anpassung an den Klimawandel aus der Sicht der Erzeugung von Lebensmitteln tierischer Herkunft. Tagung aktiver Klimaschutz und Anpassung an den Klimawandel, 15.-16.06.09, Braunschweig, S. 53-55.
- OTTO, P., E.M. LIEBLER-TENORIO, R. DILLER, J. REETZ, B. ROTH, AND U. LÖHREN. 2009. Rotaviren als ätiologischer Faktor beim Malabsorptionssyndrom der Broilerküken – Infektion, Klinik, Virusnachweis. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Fachgruppe Geflügelkrankheiten, Referatesammlung 75. Fachgespräch, Hannover, 06.-07. November 2008:15-26.
- REINKING, E. 2009. EPIZONE – Internationales Netzwerk in der Tierseuchenbekämpfung. ForschungsReport 2/2009, S. 12-14.
- SACHSE, K. 2009. DNA-Microarrays in der Diagnostik von Zoonosen. ForschungsReport 1/2009:33-35.
- SCHIRRMIEYER, H. AND M. BEER. 2009. Handel nur noch mit BVD-unverdächtigen Rindern. Top Agrar R28-R30.
- SCHOLZ, B., S. RÖNCHEN, H. HAMANN, M. HEWICKER-TRAUTWEIN AND O. DISTL. 2009. Keel bone condition in laying hens: A histological evaluation of macroscopically assessed keel bones. DVG Tagung Fachgruppe "Tierschutz", Nürtingen 26. -27. Feb. 2009, S. 144-153.
- SCHOLZ, B., S. URSELMANS, J. KJAER AND L. SCHRADER. 2009. Wahlversuch zur Präferenz unterschiedlicher Staubbadesubstrate für Legehennen. KTBL-Schrift 479:160-167.
- SCHWABE, A., U. MEYER, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Untersuchungen zum Einfluss von Seltenen Erden (SE) auf die Mast- und Schlachtleistung bei Mastbullen. Forum angewandte Forschung 01./02.04.09, S. 68-71.
- SOMMER, K., P. OTTO, R. DILLER, M. HELLER, B. ROTH, AND E.M. LIEBLER-TENORIO. 2009. Rotaviren als ätiologischer Faktor beim MAS der Broilerküken: Morphologische Veränderungen und Erregernachweis in der Darmschleimhaut. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Fachgruppe Geflügelkrankheiten, Referatesammlung 75. Fachgespräch, Hannover 06.-07. November 2008:27-39.
- SPOLDERS, M., H. GRABHERR, AND U. MEYER. 2009. Wirksamkeit von Zeolith A zur Prophylaxe der Gebärpause bei Milchkühen in Abhängigkeit von der Dosierung und dem Zeolith/Calciumverhältnis in der Ration. Forum angewandte Forschung 01./02.04.09, S. 26-29.
- SPOLDERS, M., H. GRABHERR, U. MEYER, M. FÜLL, AND G. FLACHOWSKY. 2009. Zeolith A als Futterzusatzstoff zur Prävention der subklinischen Gebärpause bei Milchkühen. Schriftenreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich, Bd. 32, Tagung vom 02.-04.09.2009 in Kartause-Ittingen, Schweiz, S. 99-104.

- ULRICH, R. G., G. HECKEL, H.-J. PELZ, L. H. WIELER, M. NORDHOFF, G. DOBLER, J. FREISE, F.-R. MATUSCHKA, J. JACOB, J. SCHMIDT-CHANASIT, F. W. GERSTENGARBE, T. JÄKEL, J. SÜSS, B. EHLERS, A. NITSCHKE, R. KALLIES, R. JOHNE, S. GÜNTHER, K. HENNING, R. GRUNOW, M. WENK, L. C. MAUL, K.-P. HUNFELD, R. WÖLFEL, G. SCHARES, H. C. SCHOLZ, S. O. BROCKMANN, M. PFEFFER, AND S. S. ESSBAUER. 2009. Nagetiere und Nagetier-assoziierte Krankheitserreger – Das Netzwerk "Nagetier-übertragene Pathogene" stellt sich vor. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 52:352-369.
- ULRICH, R. G., M. SCHLEGEL, M. MERTENS, M. H. GROSCHUP, J. SCHMIDT-CHANASIT, A. PLENGE-BÖNIG, J. JACOB, H.-J. PELZ, J. FREISE, M. WENK, J. THIEL, C. TRIEBENBACHER, E. SCHMOLZ, A. KURTH, F. KRÜGER, F. RÜHE, C. KIFFNER, H. ANSORGE, W. GERWIN, W. WEGENER, J. MÜLLER, M. BEMMANN, R. WOLF, L.-F. OTTO, R. OEHME, M. PFEFFER, G. HECKEL, S. SCHEX, AND S.S. ESSBAUER. 2009. Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“: Monitoring von Hantavirus-Infektionen in Deutschland. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 34:229-250.
- ULRICH, R. G., M. SCHLEGEL, J. SCHMIDT-CHANASIT, J. JACOB, J. FREISE, H.-J. PELZ, M. MERTENS, M. WENK, T. BÜCHNER, D. MASUR, K. SEVKE, M. MEIER, J. THIEL, C. TRIEBENBACHER, A. BUSCHMANN, J. LANG, P. W. LÖHR, R. ALLGÖWER, P. BORKENHAGEN, T. SCHRÖDER, S. ENDEPOLS, T. HEIDECKE, I. STODIAN, O. HÜPPOP, M. HORNUNG, W. FIEDLER, F. KRÜGER, F. RÜHE, F.-W. GERSTENGARBE, M. PFEFFER, W. WEGENER, M. BEMMANN, L. OHLMEYER, R. WOLF, A. GEHRKE, D. HEIDECKE, M. STUBBE, H. ZOLLER, J. KOCH, S. O. BROCKMANN, G. HECKEL, AND S. ESSBAUER. 2009. Hantaviren und Nagetiere in Deutschland: Das Netzwerk "Nagetier-übertragene Pathogene", In: Wirbeltierforschung in der Kulturlandschaft - Grundlagen und Anwendung, Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut 421:76-92.
- WERNER, D., UND H. KAMPEN. 2009. Die Kriebelmückensituation (*Diptera; Simuliidae*) in Deutschland: Schadregionen, Simuliotoxikose und Entwicklungstendenzen. Mitt Dt Ges Allg Ang Ent 17:313-317.
- ZERBE, F. 2009. Am besten auf weichem Boden. dlz agrarmagazin, Nov. 09, 21-25.
- ZERBE, F., M. KNEER, C. MAYER AND J. KJAER. 2009. Fattening bulls – floor type and stocking density effects on tail tip and carpal injuries. XIV ISAH congress 2009, Sustainable Animal Husbandry: Prevention is Better than Cure, Proc. 14th Intern. Cong. Intern. Soc. for Animal Hygiene, Hannover, 375-378.
- ZIEGLER, U. AND M.H. GROSCHUP. 2009. West-Nil-Virus – ein Virus auf dem Vormarsch. Hundkatzeperferd 04/2009:18-20.

2.3 BUCHBEITRÄGE

- AL DAHOUK, S., K. NÖCKLER, AND H. NEUBAUER. 2009. *Brucella* spp. In: Burkhardt, F., Neumeister, B. (eds.), Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie, Thieme, Stuttgart, S. 505-510.
- AL DAHOUK, S., K. NÖCKLER, AND H. TOMASO. 2009. *Brucella*. In: Liu, D. (Hrsg.) Molecular Detection of Foodborne Pathogens, CRC Press, Taylor & Francis Group, Oxford, United Kingdom, ISBN: 978-1-4200-7643-1, S. 317-330.
- ARTOIS, M., D. BICOUT, D. DOCTRINAL, R. FOUCHIER, D. GAVIER-WIDEN, A. GLOBIG, W. HAGEMEIJER, T. MUNDKUR, V. MUNSTER, AND B. OLSEN. 2009. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Europe: the risks associated with wild birds. Rev Sci Tech OIE 28:69-92.
- BERK, J. 2009. Technik in der Geflügelhaltung. Yearbook Agricultural Engineering 21:195-198.
- BERK, J. 2009. Faustzahlen zur Haltung von Mastgeflügel. Geflügeljahrbuch 2010, 158-179.
- BOHNENKEMPER, O., J. BOXBERGER, G. FLACHOWSKY, E. HARTUNG, J. HARTUNG, R. KAUFMANN, M. MARKS, G. WENDL, J. BERK, P. HILLER, K. REITER, AND A. HACKESCHMIDT. 2009. Wasserversorgung in der Geflügelhaltung. KTBL-Heft 83.
- FLOEGEL-NIESMANN, G., C. STAUBACH, S. BLOME, AND V. MOENNIG. 2009. Assessment of international inter-laboratory comparison tests for the diagnosis of Classical Swine Fever from 1998 until 2007. Rev Sci Tech OIE 28 (in press).
- FUCHS, W., A. RÖMER-OBERDORFER, J. VEITS, AND T. C. METTENLEITER. 2009. Novel avian influenza virus vaccines. Rev Sci Tech OIE 28:319-332.
- HARDER, T. 2009. Aviäre Influenza. In: Haas, W. (Hrsg.), Influenza: Prävention, Diagnostik, Therapie und öffentliche Gesundheit. Urban und Fischer, München, ISBN: 13 978-3437245305, S. 189-208.
- KEIL, G. M. 2009. Modified bovine herpesvirus 1 for protein secretion. Meth Mol Biol 515:249-260.
- MATROSOVICH, M., J. STECH, AND H. D. KLENK. 2009. Influenza receptors, polymerase and host range. Rev Sci Tech OIE 28:203-217.
- MCGAVIN, D.M AND ZACHARY, J.F. Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie / übersetzt und herausgegeben von Teifke, J.P., Löhr, C.V., Klopffleisch, R., and Marschang, R.E. Elsevier, München (2009). 1318 S. ISBN-10: 343758250X; ISBN-13: 978-3437582509
- METTENLEITER, T. 2009. Avian influenza Introduction. Rev Sci Tech OIE 28:15.

- NEUBAUER, H. 2009. *Brucella* spp., In: B. Neumeister (Hrsg.), Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie, S. 505-510.
- ROBERTS, M.C., AND S. SCHWARZ. 2009. Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. In: D.L. Mayers (ed.), Mechanism of Drug Resistance, Vol. 1. Humana Press, S. 183-191.
- RUDOLF, M., M. POPPEL, A. FRÖHLICH, T. METTENLEITER, M. BEER, AND T. HARDER. 2009. Efficacy of a commercial inactivated H5 influenza vaccine against highly pathogenic avian influenza H5N1 in waterfowl evaluated under field conditions. Rev Sci Tech OIE 28:275-291.
- SÜSS, J. 2009. FSME-, RSSE-Virus. 2009. In: B. Neumeister (Hrsg.), Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie, S. 886-891.
- SÜSS, J., AND O. KAHL. 2009. X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases: Book of Abstracts, 190 S.
- ZIMMERMANN, W., AND R. KAMMERER. 2009. Carcinoembryonic Antigen (CEA): Identification, Characterization, and Clinical Applications. In: O. Gires und B. Seliger (Hrsg.) Tumor-Associated Antigens, Wiley-VCH, Weinheim, ISBN: 978-3-527-32084-4, S. 201-218.

3 HABILITATIONSSCHRIFTEN, DISSERTATIONEN, DIPLOMARBEITEN, MASTERARBEITEN, BACHELOR THESES, VORTRÄGE UND POSTER, AUSZEICHNUNGEN UND PREISE

3.1 HABILITATIONEN

- ASCHFALK, ANSGAR (IfE): Bei der Intensivierung von Tierhaltungssystemen entstehende erregerebedingte Hygieneprobleme am Beispiel der Rentierhaltung (Universität Hohenheim, Stuttgart)
- BERNDT, ANGELA (IMP): Immunologische Untersuchungen zur aviären Salmonellose unter besonderer Berücksichtigung der gd (TCR1+)-T-Zellen (Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie)
- KUES, WILFRIED A. (ING): Experimentelle Untersuchungen zur Transgenese bei Nutztieren (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)
- FELBERT VON, INGA G. C. (IMED): Histopathologische und immunhistologische sowie zytologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Pathogenese und Therapie equiner Sarkoide (Justus-Liebig-Universität Gießen, Veterinärmedizinische Fakultät)
- FRANKE, KATRIN (ITE): Effect of various iodine supplementations and species on the iodine transfer into milk and on serum, urinary and fecal iodine of dairy cows fed rations varying in the glucosinolate content (Universität Halle)
- FREULING, CONRAD (IfE): Genetische Charakterisierung von europäischen Fledermaustollwutviren in Deutschland und Untersuchungen zu ihrer spatiotemporalen Diversität (Tierärztliche Hochschule Hannover)
- GRABHERR, HILDE (ITE): Einfluss von Zeolith A auf die Futteraufnahme, den Mineralstoff- und Energiestoffwechsel im peripartalen Zeitraum sowie auf verdauungsphysiologische Parameter und Abbauverhalten im Gastrointestinaltrakt von Milchkühen (Universität Leipzig)

3.2 DISSERTATIONEN

- BEHR, BRITTA (ING): The biotechnological potential for manipulating offspring sex in the rhinoceros and the elephant (Leibniz Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin)
- DIJK VAN, JOBKE (ING): Aetiological and pharmacological approaches to perinatal asphyxia in the pig (Universität Utrecht, Veterinärmedizinische Fakultät)
- HÄUSLAIGNER, RAFAELA (IVD): Einsatz eines gegen die leichte Kette von Pekingenten-Immunglobulin gerichteten monoklonalen Antikörpers für die Etablierung eines Newcastle Disease-ELISA zur Überprüfung der humoralen Impfreaktion beim Wassergeflügel (Ludwig-Maximilians-Universität München)
- HUTHMANN, EVA (IVD): Untersuchungen an Ringeltauben (*Columba palumbus*) zum Nachweis von Infektionen

- mit dem aviären Paramyxovirus 1 (APMV-1) (Ludwig-Maximilians-Universität München)
- KNEUCKER, ANNETTE** (IMP): Funktionelle Residualkapazität und Diffusionskapazität der Lunge bei Kalb und Schwein: Physiologische Werte und Einfluss respiratorischer Infektionen (Freie Universität Berlin)
- KÜHNEL, DENIS** (IMB): Untersuchung der zytotoxischen Aktivität unterschiedlich virulenter NDV-Stämme auf Krebszelllinien (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald)
- KUTZER, TANJA** (ITT): Untersuchungen zum Einfluss der frühzeitigen Kontaktmöglichkeiten zwischen Ferkelwürfen auf Sozialverhalten, Gesundheit und Leistung (Justus-Liebig-Universität, Gießen)
- LUTTERMANN, CHRISTINE** (IfI): Untersuchung des Terminations/Reinitiations-Mechanismus der Translation des kleinen Kapsidproteins beim Felinen Calicivirus (Eberhard-Karls-Universität Tübingen)
- MÜLLER, INGETRAUD** (IVD): Studien zum Verlauf einer *in ovo* Infektion in Haushühnern (*Gallus gallus*) mit einem ausgewählten Aviären Orthoreovirusisolat (Ludwig-Maximilians-Universität München)
- NIEHOFF, INKA-DONATA** (ITE): Investigations on the effects of niacin supplementation to different rations on rumen fermentation, duodenal nutrient flow and several serum and milk parameters of dairy cows (Universität Kiel)
- OROPEZA, MARIANNE** (ING): Production of hA20-transgenic pigs by somatic cell nuclear transfer for xenotransplantation research. (Tierärztliche Hochschule Hannover)
- RACEDO, SILVIA** (ING): Effects of follicle size and stage of maturation on mRNA expression and protein distribution in bovine *in vitro* matured oocytes. (University of Buenos Aires, Argentinien)
- RAGALLER, VERONIKA** (ITE): Effects of folic acid and pantothenic acid supplementation to two rations on rumen fermentation, duodenal nutrient flow and serum and milk variables in dairy cows (Universität Bonn)
- SCHEPERS, MICHAELA** (IfI): Immunhistochemische Untersuchungen zur Myelinisierung und Rolle der Oligodendroglia im Gehirn nach neonataler aerogener Infektion von Lewis Ratten mit dem Borna Disease Virus (Justus-Liebig-Universität Gießen)
- WÄCKERLIN, REGULA** (IVD): Untersuchungen zu Infektionsverlauf und Ausbildung einer protektiven Immunität im Haushuhn (*Gallus gallus*) nach *in ovo* Infektion mit einem pathogenen aviären Paramyxovirusisolat vom Serotyp 1 (Ludwig-Maximilians-Universität München)
- WILKING, HENDRIK** (IfE): Molekulare Epidemiologie und Mikroevolution aviärer extraintestinal pathogener *Escherichia coli* (APEC) (Freie Universität Berlin)
- ZARAZA GONZALES, JAVIER** (ING): Cellular and molecular characteristics of preimplantation *in vitro* produced embryos from pre- and postpubertal heifers and their relationship with apoptosis. (Tierärztliche Hochschule Hannover)

3.3 DIPLOMARBEITEN

- DECKER, SARAH** (IfI): Klonierung von Influenza Genen zur Herstellung von Nanopartikel basierten genetischen Vakzinen (Universität Hohenheim, Stuttgart)
- EMSCHERMANN, FRÉDÉRIC** (IfI): Einfluss des Orf Virus auf die MHC-I Oberflächenexpression (Eberhard-Karls-Universität, Tübingen)
- FISCHER, MARTINA** (IVD): Mathematische Analyse von Genome Sequencer FLX Datensätzen zur Bestimmung der Quasispezieszusammensetzung aviärer Influenza-Virusisolate (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald)
- GERST, BASTIAN** (IMP): Diagnostik-Methoden im Vergleich: Molekularer und konventioneller Nachweis von Tuberkulose-Erregern beim Rind (Freie Universität Berlin)
- GLOWINSKI, FRITHJOF** (IMB): Quantitative Proteomanalyse von Zellkernen Herpesvirus-infizierter Zellen (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald)
- HEINRICH, JULIA** (IMB): Molekularbiologische Untersuchung zur Funktion rhabdoviraler Polymerasekomplexe (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald)
- HELLER, CORINA** (IfI): Einflussnahme von E7 Proteinen aus High- und Low-Risk HPV-Typen auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation (Eberhard-Karls-Universität Tübingen)
- HETTLER, ALICE** (IfI): Untersuchungen zur Rolle der Autophagie nach Influenza A Virusinfektion (Eberhard-Karls-Universität Tübingen)
- KREHER, FELIX** (IfI): RNA structure/function analysis of a calicivirus RNA element promoting reinitiation of translation after termination (Eberhard-Karls-Universität Tübingen)
- MÜLLER, ANTJE** (IfI): Vergleichende Untersuchungen zur Einflussnahme der viralen Evasionsproteine HPV E5 und BPV D5 auf die MHC I vermittelte Antigenpräsentation (Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

PORSCHA, SONJA (ING): Auswirkungen von Patenten auf die Nutztierproduktion in Europa unter besonderer Berücksichtigung der §§ 52 ff. des Europäischen Patentübereinkommens (Fachhochschule des Bundes für öffentliche Verwaltung, Brühl)

RENNER, LYDIA (ITE): Einfluss von seltenen Erden auf die Proliferation boviner peripherer mononukleärer Zellen nach *in vitro* und *in vivo* Exposition (Universität Jena)

ROSENFELD, ULRIKE (IMB): Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion des Tollwutvirus Matrixproteins in der Virusmorphogenese (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald)

WESTHAUS, SANDRA (IfI): Einfluss des Interferon Systems auf die Replikation und Pathogenität von H5N1 Influenza Viren (Universität Jena)

WILKERLING, KATRIN (ITE): Entwicklung einer LC/MS/MS-Methode zur Analyse der Anreicherung von [²H₅]-Phenylalanin-markierten Proteinen zur Bestimmung gewebespezifischer Proteinsyntheseraten (Universität Halle)

3.4 MASTERARBEITEN

ARLINGHAUS, ANDREAS (ING): Auswirkungen verschiedener Auftauverfahren auf die Qualität geschlechtsspezifisch differenzierter Spermien (Universität Göttingen)

GRABOW, MARTIN (ITE): Einflussfaktoren auf die Wasseraufnahme von weiblichen Aufzuchttrindern (Universität Göttingen)

HÜNERBERG, MARTIN (ITE): Zur Bedeutung von Sojaschrot als Quelle von Isoflavonen in Kuhmilch (Universität Göttingen)

LOHÖLTER, MALTE (ITE): Ruminale *in sacco* Abbaubarkeit von unter simulierten zukünftigen Anbaubedingungen (Projekt FACE – Free Air Carbondioxide Enrichment) produzierter Maissilage (Universität Gießen)

3.5 BACHELOR THESES

KERN, JANOSCH (IfI): Herstellung und Charakterisierung neuer Orf Virus-Rekombinanten (Hochschule Furtwangen)

KORBELY, SUSANNE (IMB): Vorfraktionierung von stabil isotoopenmarkierten Proteingemischen für die Proteomanalyse durch isoelektrische Fokussierung in granulierten SephadexTM Gelen (Technische Fachhochschule Wildau)

LEHLE, ANNA (IfI): Beeinflussung der Bildung der pathologischen Isoform des Prionproteins durch monoklonale Antikörper (Hochschule Furtwangen)

MEYER-HAMME, SOPHIE (ITE): Einfluss von Fumarat und *Yucca schidigera* Extrakt im Futter auf Parameter des ruminalen Abbaus *in sacco* (Universität Göttingen)

URSELMANS, STEFANIE (ITT): Wahlversuch zur Präferenz unterschiedlicher Staubbadesubstrate für Legehennen (Van Hall Larenstein University of Applied Sciences, Leeuwarden)

3.6 VORTRÄGE UND POSTER

Angehörige des FLI präsentieren regelmäßig die Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Fachtagungen. Aus Platzgründen werden diese nicht einzeln aufgeführt.

3.7 AUSZEICHNUNGEN UND PREISE

DR. JUTTA BERK (ITT): Ulmer Praxispreis Rang 1 der Verlags Eugen Ulmer, Deutschland

FRANZISKA GIERKE (IMP): Richard Merkall Memorial Fellowship der International Association for Paratuberculosis für die Präsentation der Forschungsergebnisse (Vortrag) auf dem 10th International Colloquium on Paratuberculosis, Minneapolis, USA

PROF. DR. GERHARD FLACHOWSKY (ITE): Professor Niklas-Medaille in Silber, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Deutschland

PHD KRISTINA KADLEC (ING): ECCMID Travel Grant für die Präsentation herausragender Forschungsergebnisse der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finnland

HARTMUT LENTZ (IfE): Nachwuchspreis des Vorstandes des Schweizer Forums für Epidemiologie, Schweiz

DR. BRITTA SCHOLZ (ITT): Förderpreis für ausgezeichnete Dissertation der Deutschen Vereinigung für Geflügelwissenschaften e.V. (WPSA), Vechta, Deutschland

PROF. DR. THOMAS SELHORST (IfE): Ernennung zum außerplanmäßigen Professor für prognostische Epidemiologie, Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Deutschland

