UNTERSUCHUNG ZUM VORKOMMEN VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS "TICK BORNE ENCEPHALITIS VIRUS" (TBEV) BEIM PFERD IM ENDEMIEGEBIET MARBURG-BIEDENKOPF

KATHARINA MÜLLER

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Institut für Virologie des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Untersuchung zum Vorkommen von Antikörpern gegen das "Tick Borne Encephalitis Virus" (TBEV) beim Pferd im Endemiegebiet Marburg-Biedenkopf

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Katharina Müller

Tierärztin aus Grünstadt

Giessen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan:
Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:
Prof. Dr. H-J. Thiel

Gutachterin:
PD Dr. K. Fey

Tag der Disputation:
12.06.2006

Meinen Eltern

Jeden Augenblick des Lebens, er falle, aus welcher Hand
des Schicksals er wolle, uns zu, den günstigen, so wie den
ungünstigen, zum bestmöglichen zu machen, darin besteht
die Kunst des Lebens, und das eigentliche Vorrecht
eines vernünftigen Wesens.

Georg Christoph Lichtenberg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Betreuung von Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel angefertigt.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für Rat, Unterstützung, immerwährende gute Laune und die Gelegenheit diese Arbeit am Institut für Virologie anfertigen zu können.

Dr. Matthias König für seine grenzenlose Geduld und die hervorragende wissenschaftlich engagierte persönliche Betreuung.

den Mitarbeitern des Instituts für Virologie für stete Hilfsbereitschaft und ein gutes Arbeitsklima.

den Mitarbeitern der Fa. Chiron-Behring, Marburg, insbesondere Dr. Schmeel, Herr Quentin, Frau Dr. Hilbert ohne deren Hilfe die Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

der Familie Geilhof, besonders Thomas Geilhof, für Hilfsbereitschaft, Unterstützung, den Impuls zu dieser Arbeit und für die Gelegenheit, an seinem Pferd „Rinaldo“ den Impfversuch durchführen zu dürfen.

allen Pferdebesitzer im Raum Marburg-Biedenkopf, die ihre Pferde zur Probennahme zur Verfügung gestellt haben. Herzlichen Dank auch: Ulf Bayer und dem Team der Klinik Landgrebe, Dr. Winter, Karen Kötter.

Dr. Failing und Dr. Artl für eine sehr freundliche statistische Betreuung, Dr. Hans-Peter Lammerich.

Inhaltsverzeichnis

1.1.	Abkürzungsverzeichnis	1
2.	Einleitung	4
2.1.	Allgemeines	4
2.2.	Ätiologie	5
2.2.1.	Taxonomie	5
2.2.1.1.	Familie der Flaviviridae	5
2.2.1.2.	Genus Flavivirus	6
2.2.1.3.	TBE Virus Komplex	9
2.2.1.4.	Morphologie von TBEV	9
2.2.1.5.	Tenazität	10
2.3.	Erkrankungen durch Flaviviren bei Mensch und Tier	10
2.3.1.	TBE in der Humanmedizin	10
2.3.1.1.	Pathologie und Pathogenese	11
2.3.1.2.	Diagnostik	13
2.3.1.3.	Differentialdiagnosen	14
2.3.1.4.	Prophylaxe und Therapie	15
2.3.2.	TBE in der Tiermedizin	17
2.3.2.1.	TBE beim Hund	17
2.3.2.2.	TBE bei Wiederkäuern	20
2.3.2.3.	TBE bei Pferden	21
2.3.3.	Übertragungswege und Vektoren	25
2.3.3.1.	Übertragungszyklus	25
2.3.3.2.	Virusübertragung	28
2.3.3.3.	Der Vektor	28
2.3.3.4.	Pathogenese	33
2.3.3.5.	Epidemiologie	33
2.4.	Endemiegebiete	36
2.5.	Zielsetzung der Studie	38
3.	Material und Methoden	40
3.1.	Material	40
3.1.1.	Biologische Materialien	40
3.1.2.	Puffer und Medien	41
3.1.3.	Enzyme	42
3.1.4.	Primer	43
3.1.5.	Chemikalien	43

3.1.6.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	43
3.2.	Methoden	45
3.2.1.	Etablierung der Methoden	45
3.2.1.1.	Gewinnung der positiven Kontrollseren	45
3.2.1.2.	Gewinnung der negativen Kontrollseren	45
3.2.1.3.	Gewinnung der Testseren	46
3.2.1.4.	Vermehrung der Kulturzellen	46
3.2.1.5.	Infektion von Kulturzellen und Ernte von Kulturüberstand	48
3.2.1.6.	SNT	49
3.2.1.7.	ELISA	52
3.2.1.8.	PCR	54
4.	Ergebnisse	61
4.1.	Etablierung der Methoden	61
4.1.1.	Serumneutralisationstest (SNT)	61
4.1.2.	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	62
4.1.3.	Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)	63
4.1.4.	Feldversuch	65
4.1.4.1.	Auswahl der Proben	65
4.2.	Auswertung der Serumproben	67
4.2.1.	Impfung - Gewinnung eines positiven Referenzserums	67
4.2.2.	Untersuchungsergebnisse der Proben aus dem Feldversuch	68
4.2.2.1.	Ergebnisse SNT	68
4.2.2.2.	Ergebnisse ELISA	70
4.2.2.3.	SNT- und ELISA-Ergebnisse im Vergleich	71
4.2.2.4.	Ergebnisse RT-PCR	73
4.2.3.	Verteilung der seropositiven Proben	74
4.2.3.1.	Verteilung nach Rasse	74
4.2.3.2.	Geschlechterverteilung	75
4.2.3.3.	Altersverteilung	75
4.2.3.4.	Haltungsform	76
4.2.4.	Klinische Symptome der seropositiven Reagenten	76
5.	Diskussion	78
6.	Zusammenfassung	88
7.	Summary	89
8.	Literaturverzeichnis	90
9.	Anhang	94
9.1.	Protokollblatt RT-PCR	94

9.2.	Protokoll Trypanblauexklusionstest	96
9.3.	Rohdaten	97
9.3.1.	Daten SNT	98
9.3.2.	Daten ELISA	108

1.1. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
AST	Aspartataminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
Aq. dd	Doppelt deionisiertes Wasser
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BfR	Bundesamt für Risikobewertung
CCM	Cell Culture Medium
CEE	Zentraleuropäische Enzephalitis
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
CPE	Cytopathischer Effekt
CSF	Cerebrospinalfluid
d	Tage
DF	Dengue Fieber
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Na_2 Salz
EHV	Equines Herpesvirus
EIA	Enzyme immuno assay
ESE	Frühsommerenzephalitis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FKS	Foetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
FSME	Frühsommermeningoenzephalitis
FSMEV	Frühsommermeningoenzephalitis Virus
g	Gramm
GOT	Glutamyloxidat Transferase

h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_2SO_4	Schwefelsäure
HHT	Hämagglutinationshemmungstest
ID	Identifikationsnummer
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
incl.	Inclusive
IFSG	Infektionsschutzgesetz
l	Liter
M	Molar
m	Milli
mAk	Monoklonale Antikörper
min	Minute
n.d.	not done, Probe nicht gewonnen, bzw. getestet
ND_{50}	50% Neutralisationsdosis
O.D.	Optical Density
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RIA	Radioimmunoassay
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid
RSSE	Russian Spring Summer Encephalitis
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNT	Serumneutralisationstest
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TBE	Tick Borne Encephalitis
TBEV	Tick Borne Encephalitis Virus
TBEV-FE	Tick Borne Encephalitis Virus Far East
TBEV-S	Tick Borne Encephalitis Virus Siberian
TBEV-W	Tick Borne Enzephalitis Virus West
$TCID_{50}$	50% Tissue Culture Infectious Dose

TMB	3´,3´,5´,5´-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
UdSSR	Union der Sozialist. Sowjetrepubliken
unbkt	Unbekannt
v/v	Volumenprozent
VGV	Virusgebrauchsverdünnung
w/v	Gewichtsprozent
ZNS	Zentrales Nervensystem
zpE	Zytopathischer Effekt

2. Einleitung

2.1. Allgemeines

Der Terminus "Tick Borne Encephalitis" (TBE) bezeichnet eine durch Flaviviren hervorgerufene und via Zeckenbiss auf Vertebraten übertragene Erkrankung. Das Krankheitsbild ist charakterisiert durch Infektionen des ZNS und der Meningen. Die TBE hat viele Synonyme. Ihre in Deutschland gebräuchlichste Bezeichnung: FSME (Frühsommermeningoenzephalitis) geht auf Krausler et al. zurück und drückt aus, dass im Frühsommer die Erkrankungsrate am höchsten ist (Krausler et al., 1958). Weitere Bezeichnungen sind:

Zecken-Enzephalitis („l´encephalite a tiques“),
Western Tick-Borne Encephalitis,
Tick-borne disease,
CEE (Central European Encephalitis),
ESE (Early Summer Encephalitis),
RSSE (Russian Spring Summer Encephalitis),
Biphasisches Milchfieber,
Biphasische Meningoenzephalitis,
Sommer-Enzephalitis,
Schneidersche Krankheit,
Österreichische Krankheit,
Kumlinge Disease.

Die Begriffe CEE und RSSE beschreiben die regionale Ausprägung der TBE in Zentraleuropa und im russischen Raum. Die in der ehemaligen UdSSR beobachtete fernöstliche Variante oder RSSE wird auch Taiga-Enzephalitis genannt. Biphasisches Milchfieber benennt den Verlauf der TBE mit zwei Fieberphasen und die mögliche orale Übertragung über unzureichend erhitzte Milchprodukte. Ebenso verhält es sich mit dem Begriff Biphasische Meningoenzephalitis, der sich auf die zwei Fieberphasen bezieht und die betroffenen Organe präziser beschreibt, da sowohl eine isolierte Enzephalitis oder Meningitis als auch eine Meningoenzephalitis vorkommen können. Die historische Bezeichnung "Schneidersche Krankheit" weist auf den Erstbeschreiber der TBE in Österreich hin (Schneider 1931). Kumlinge Disease schließlich deutet auf das Vorkommen der TBE auf der Insel Kumlinge im Südwesten Finnlands hin.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Begriff TBE als Bezeichnung der durch bestimmte Flaviviren verursachten Erkrankungen bei Mensch und Tier verwendet, da dieser

keine regionale Begrenzung beinhaltet. Hierunter fallen Erkrankungen, die durch die Erreger des europäischen, fernöstlichen und sibirischen Typs verursacht werden und sich neben der geographischen Verbreitung vor allem durch die Schwere der klinischen Ausprägung unterscheiden. Die Bezeichnung TBE-Virus (TBEV) wird für die der TBE zugrunde liegenden Erreger verwendet.

2.2. Ätiologie

2.2.1. Taxonomie

2.2.1.1. Familie der Flaviviridae

Die Erreger der TBE werden zur Virusfamilie der Flaviviridae gezählt.

Familie	Genus	Spezies
Flaviviridae	Flavivirus	TBEV, LIV, JEV, u.a.
	Pestivirus	BVDV, KSPV, BDV
	Hepacivirus	Hepatitis C Virus

Tabelle 1: Taxonomie der Flaviviren. LIV=Louping Ill Virus, JEV=Japanisches Enzephalitis Virus, BVDV=Bovine viral Diarrhea Virus (Bovine Virusdiarrhoe), KSPV=Virus der klassischen Schweinepest, BDV=Border Disease Virus der Schafe.

Zu den Flaviviridae gehören drei Genera: Flavivirus, Pestivirus und Hepacivirus. Vertreter aus diesen drei Genera besitzen unterschiedliche biologische Eigenschaften und zeigen keine serologischen Kreuzreaktionen. Sie ähneln sich jedoch in der Morphologie der Virionen, der Genomorganisation und ihrer Strategie der RNA Replikation.
Namensgebend für diese Familie behüllter Viruspartikel war der Prototypvertreter Gelbfiebervirus, der Erreger des Gelbfiebers beim Menschen. Flaviviren zeigen bezüglich ihrer Morphologie gewisse Ähnlichkeiten mit den Togaviren. Deshalb waren sie früher als Genus Flavivirus innerhalb der Familie der Togaviridae angesiedelt. Das Genom der Flaviviren besteht aus einer linearen Einzelstrang-RNA positiver Polarität. Die meisten Vertreter des Genus Flavivirus werden durch infizierte Arthropoden als Vektoren übertragen, weshalb sie früher als ARBO- (Arthropod borne Virus) Viren bezeichnet wurden (Liess und Kaaden 2003).

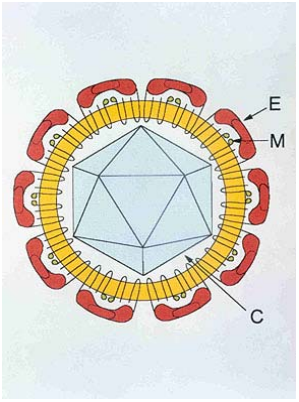

Abbildung 1: Die schematische Darstellung eines Flaviviruspartikels (Heinz 1996)
E= Hüllglycoprotein (envelope), M= Membranprotein (membrane), C=Nucleocapsidprotein (core).

Bei den Flaviviren handelt es sich um kleine (ca. 50nm) sphärische Viren mit einer Lipidhülle, deren Kapsid aus einem singulären kleinen basischen Kapsidprotein aufgebaut wird. In die Virusmembran sind zwei (Flaviviren, Hepaciviren) oder drei (Pestiviren) membranassoziierte Glykoproteine integriert. Die Nichtstrukturproteine beinhalten charakteristische Sequenzmotive einer Serinprotease, RNA Helikase und einer RNA-abhängigen RNA Polymerase, die an ähnlichen Lokalisationen im Genom der Vertreter aus allen drei Genera kodiert werden (Heinz et al., 2000).

2.2.1.2. Genus Flavivirus

Das Genus Flavivirus der Familie Flaviviridae beinhaltet über 70 Mitglieder. Von diesen werden 34 durch Stechmücken übertragen (Mosquito-borne), 17 haben Zecken als obligaten Vektor (Tick-borne) und für 22 ist bisher kein Vektor bekannt.
Flaviviren sind weltweit verbreitet, sie zeigen eine erhebliche epidemiologische Dynamik. Klimaschwankungen, der Einsatz von Insektiziden sowie Veränderungen der Biosysteme haben einen direkten Einfluss auf die Populationsdichte der Vektoren und das Wirtsreservoir. Sie zirkulieren vor allem zwischen Nagern und Fledermäusen. Viele der Übertragungszyklen sind noch nicht erforscht.

Die Vertreter aus dem Genus Flavivirus sind antigenetisch miteinander verwandt. Yellow Fever (YF), Dengue Fever (DF), Japanese Encephalitis (JE) und Tick Borne Encephalitis (TBE) Viren gehören jeweils verschiedenen Serokomplexen an. Durch eine Dengue-Virusinfektion oder eine Gelbfieberimpfung werden Antikörper induziert, die in zur Diagnostik eingesetzten Immunoassays mit anderen Flaviviren kreuzreagieren und so zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Obwohl es in der Regel nicht zur Kreuzprotektion zwischen verschiedenen Serokomplexen aus dem Genus Flavivirus kommt, ist eine

Kreuzreaktion in verschiedenen diagnostischen Testsystemen wie dem HHT, SNT oder EIA möglich (Holzmann 1999).
Etwa vierzig Virusspezies aus dem Genus Flavivirus verursachen Erkrankungen beim Menschen. In der Gruppe der Flaviviren, die durch Zecken übertragen werden, die sogenannten Tick-borne Viren, fungieren Vertebraten als Zwischenwirte. Zeckenarten der Gattungen Ixodes, Dermacentor und Haemaphysalis sind die hauptsächlichen Überträger. Zu den Tick-borne Viren gehören die Erreger der folgenden Erkrankungen:

- TBE, European subtype (Central European Encephalitis: CEE)
- TBE, Eastern subtype (Russian Spring Summer Encephalitis: RSSE)
- Louping ill (LI) in Schottland and Negishi Virus Encephalitis in Japan
- Powassan Encephalitis (PE) and Modoc Virus Encephalitis in Nordamerika
- Kyasanur Forest disease (KFD) in Indien
- Alkhurma hemorrhagic fever in Saudi Arabien
- Omsk hemorrhagic fever (OHF) in Sibirien

In der Gruppe der Mosquito-borne Viren, der durch Stechmücken übertragenen Viren, sind Vögel die wichtigsten Zwischenwirte. Schweine und Pferde können ebenfalls in den Zyklus involviert sein und Erkrankungen entwickeln. Stechmücken der Gattung Culex sind die wichtigsten Überträger. Die folgenden Erkrankungen werden durch Mosquito-borne Flaviviren hervorgerufen:

- Japanese Encephalitis (JE) in Südost Asien
- Murray Valley Encephalitis (MVE) in Australien und New Guinea
- Kunjin Virus Encephalitis in Australien
- St. Louis Encephalitis (SLE) in Nord- und Südamerika
- Rocio Encephalitis (RE) in Südamerika
- West Nile Fever (WN) in Afrika, Europa, Asien und Nordamerika
- Usutu Virus Fever in Afrika und Europa
- Wesselsbron Fever in Afrika
- Yellow Fever (YF) in Zentralafrika und Südamerika
- Dengue Fever (DEN type 1-4) und Dengue hemorrhagic fever (DHF) in Asien, Afrika, Zentral- und Südamerika

Überträger vom Wesselsbron Fever, Yellow Fever und Dengue Fever sind Stechmücken der Gattung Aedes. Am Dengue-Fieber und seinen mitunter fatalen Formen, wie Haemorrhagisches Fieber und Schocksyndrom, erkranken ca. 80 Millionen Menschen pro

Jahr. Einen besonderen Bekanntheitsgrad erlangte das West Nile Fever (WN) Virus, das sich in den USA nach erstmaligem Auftreten 1999 rasant ausbreitete. Gegen Yellow Fever (YF), Japanese Encephalitis (JE), Tick Borne Encephalitis (TBE) und West Nile (WN) sind Impfstoffe verfügbar.

	Gruppe	Vertreter
Flaviviren	TBE (12, T)	TBEV-W, TBEV-S, TBEV-FE
	Rio Bravo (6, T)	Rio Bravo Virus
	JE (10, M)	JEV, KUNV, MVEV, SLEV, WNV
	Tyuleniy (3, T)	Tyuleniy Virus
	Ntaya (5, M)	Ntaya Virus
	Uganda S (4, M)	Uganda S Virus
	Dengue (4, M)	Dengue type Virus 1-4
	Modoc (5, U)	Modoc Virus
	Ohne Gruppe (17, M)	YFV

Tabelle 2: Mitglieder des Genus Flavivirus (Calisher 1988)
Die Zahlen in den Klammern bezeichnen die Anzahl der Gruppenmitglieder, T steht für die Zecke (tick) als Überträger, M für Moskito (mosquito) als Überträger, U steht für unbekannte Überträger. Unter der Bezeichnung Vertreter werden die wichtigsten Mitglieder aufgeführt.

Auf der Basis von Kreuzreaktionen, bei denen polyklonale Hyperimmunseren benutzt wurden, erfolgte die Einteilung der Flaviviren in acht antigenetische Gruppen, wie in Tabelle 2 dargestellt. Leider passen viele Viren, wie z.B. das Gelbfieber Virus (YFV), nicht in diese Einteilung. Desweiteren sind viele neue Viren nach Erstellung dieser serologischen Klassifizierung entdeckt worden, die nicht in dieses System integriert werden können.
Die Schwierigkeit bei der Einteilung der Flaviviren besteht aufgrund der Vielzahl verschiedener Erreger mit unterschiedlicher geographischer Verbreitung, unterschiedlichen Vektoren und biologischen Übertragungswegen. Erschwerend kommt die uneinheitliche Virusnomenklatur in der Literatur dazu.
Die Tick-borne Enzephalitis Virusstämme, die ursprünglich im westlichen Europa isoliert wurden, wurden TBE-Viren genannt. Eine wachsende Anzahl von Viren ohne einheitliche Klassifikation wurde in diesen sogenannten TBE Virus Komplex integriert. Es wäre an der Zeit, objektive Kriterien zur Klassifikation der Flaviviren aufzustellen (Calisher 1988).
Es wurde versucht, eine molekulargenetische Klassifikation dieser Viren zu erstellen. Weniger als ein Drittel vor allem der Mosquito- und Tick-borne Viren wurde benutzt, um

phylogenetische Stammbäume zu kreieren, mit dem Ziel Verwandtschaftsbeziehungen darzustellen. Leider konnten für die Gruppe, die nicht von einem bekannten Vektor übertragen wird (Non-Vektor Gruppe) nur unvollständige Stammbäume erstellt werden (Blok und Gibbs 1995).

2.2.1.3. TBE Virus Komplex

Der TBE Virus Komplex besteht aus 17 antigenetisch eng verwandten Viren, von denen 13 humanmedizinische Bedeutung haben.
Es gibt drei eng verwandte Subtypen des TBE Virus: den europäischen oder westlichen (TBE-W), den fernöstlichen (TBE-FE) und den sibirischen Subtyp (TBE-S). Der europäische und der fernöstliche Subtyp sind sehr eng verwandt. Beide zeigen Übereinstimmungen von mehr als 96% der Aminosäuren im Bereich des E-Proteins, unterscheiden sich jedoch in Hinblick auf ihre Vektoren und in der Ausprägung der klinischen Symptomatik.

2.2.1.4. Morphologie von TBEV

Das Virion besteht aus einem ikosaedralen Kapsid mit einer sphaerischen lipidhaltigen Hülle (Lindenbach et al., 2001). Es ist 45-60 nm gross und besteht zu 6% aus RNA, 66% aus Protein, 9% Carbohydrat und 17% Lipiden. Das Genom der Flaviviren besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit einer Länge von etwa 11 kb. Die Replikation erfolgt im Zytoplasma in Assoziation mit Membranen und zytoplasmatischen Vesikeln. Drei virale Proteine sind mit dem Virion assoziiert: das E- (envelope), M- (membrane) und das C- (capsid) Protein. Das M- und das E-Protein sind beide mittels einer hydrophoben Sequenz in der Lipidhülle verankert.
Das E-Protein ist das wichtigste Oberflächenprotein des Viruspartikels. Es interagiert mit den zellulären Rezeptoren und vermittelt die Fusion des Virus mit der Zellmembran. Durch Rezeptor vermittelte Endozytose werden die Viren in die Zelle aufgenommen. Antikörper, welche die Virusinfektiosität neutralisieren, erkennen dieses Protein. Mutationen des E-Proteins können die Virulenz beeinflussen.
Das M-Protein ist ein kleines proteolytisches Fragment des prM Proteins, welches für die Reifung des Viruspartikels bis zum infektiösen Stadium eine wichtige Rolle spielt. Diskrete Nukleokapside, bestehend aus C-Protein und RNA, können nach Solubilisation der Hülle mit nicht-ionischen Detergenzien isoliert werden. Das C-Protein ist sehr basisch und hat vorrangig die Aufgabe, einen Ribonukleoproteinkomplex mit eingelagerter Genom-RNA zu formen. Da die Hülle einen hohen Lipidanteil hat, können die Flaviviren sehr gut durch organische Lösungsmittel und Detergenzien inaktiviert werden.

2.2.1.5. Tenazität

Das TBE Virus ist relativ stabil, es ist in Milch und Butter bis zu zwei Monate infektiös, in saurer Milch bei 4°C bis zu 24 Stunden. Durch Pasteurisierung sowie durch Proteasen wird der Erreger inaktiviert. Eine Inaktivierung ist durch alle gängigen Desinfektionsmittel, Formalin und Säuren wie zB. Schwefelsäure möglich. Virussuspensionen verlieren bei 37°C innerhalb von 3h die Hälfte ihrer Infektiosität.

2.3. Erkrankungen durch Flaviviren bei Mensch und Tier

2.3.1. TBE in der Humanmedizin

Das Jahr 1931 markiert einen wichtigen Meilenstein in der Entdeckung von Infektionskrankheiten, die durch Zecken übertragen werden. Die Erstentdeckung der TBE und erste Veröffentlichung erfolgte unter dem Namen `Schneidersche Krankheit` durch Dr. Hans Schneider (Schneider 1931). Bereits 1927 war es dem österreichischen Primärarzt Dr. Schneider im Bezirk Neunkirchen in Niederösterreich gelungen, den Zusammenhang herzustellen zwischen der jahreszeitassoziierten aseptischen Meningitis serosa und Zecken als Vektor (Lentze 2003). Er benannte als Leitsymtome plötzliches Fieber, Angina, Übelkeit und seltener Gelenksschmerzen. Im Blutbild dokumentierte er eine geringgradige Leukozytose. Liquor und Blut testete er negativ auf Bakterienkulturen. Die so definierte Erkrankung trat regelmässig in dieser Region in Niederösterreich im Frühsommer auf.
In der ehemaligen UdSSR wurde 1933 erstmals eine Infektion des ZNS, die mit schweren Verläufen einherging und eine Letalität von 30 bis 38% verursachte, von russischen Forschern beobachtet. Silber et al. isolierten 1937 als kausalen Erreger ein Virus aus dem menschlichen Gehirn und demonstrierten die Übertragung durch die Zeckenart Ixodes persulcatus (Woessner et al., 2001).
Ab 1944 wurde von weniger schweren Formen der TBE aus dem europäischen Teil Russlands berichtet, seit 1949 gehäuft aus Mitteleuropa. 1948 kam es während einer Epidemie zur erstmaligen Beschreibung der mitteleuropäischen Variante in der CSSR (Gallia et al., 1948). Das Virus wurde aus menschlichem Gehirn isoliert und vom Fernöstlichen Typ differenziert.
In Österreich gelang die erste Virusisolierung 1953 (Groll et al., 1965). Nach genauerer Kenntnis der Erkrankung wurde die TBE in Ungarn und Bulgarien 1954, in Jugoslawien 1955, in Schweden und Albanien 1958, in Ostdeutschland 1959, in Rumänien 1960, in

Finnland 1961, in Dänemark 1963, in Griechenland und Westdeutschland 1964, in Italien 1967, in Frankreich und der Schweiz 1969, in Polen 1975, in Lettland und Estland 1993 erstmals erkannt und davon berichtet.

2.3.1.1. Pathologie und Pathogenese

Die Central European Encephalitis (CEE), verursacht von sogenannten westlichen oder europäischen Subtypen der Tick Borne Encephalitis (TBE-W) Viren stellt die wichtigste Flavivirusinfektion des Menschen in Europa dar. Eng verwandt mit dem TBE-W Virus sind die Verursacher der östlichen TBE (TBE-FE und TBE-S), welche die Russian Spring Summer Encephalitis (RSSE) verursachen, auch Far Eastern Encephalitis genannt. Diese Subtypen werden von anderen Zeckenspezies übertragen. Ausserdem verläuft die CEE milder als die RSSE und hat meist einen biphasischen Verlauf, es kann aber auch eines der beiden Stadien fehlen.
In Europa verlaufen über 60% aller Infektionen mit TBE-W Virus inapparent. Bei 10-30% der Infizierten kommt es zur klinisch manifesten Erkrankung des ZNS. Die Infektionsrate der Zecken mit dem TBE-W Virus variiert zwischen 0,1 und maximal 5% (Kaiser 2002).
Infektionen ereignen sich meist zwischen April und November, Erkrankungsfälle werden meist im Hochsommer (Juni-Oktober) apparent und nicht, wie durch die Namensgebung FSME (Frühsommermeningoenzephalitis) zu vermuten wäre, im Frühsommer.
Die typische durch CEEV hervorgerufene TBE zeichnet sich aus durch

- eine durchschnittliche Inkubationszeit von einer Woche (3-14d)
- das Prodromalstadium, in 71% der Fälle mit klinischer Manifestation, mit unspezifischen Symptomen ähnlich einem fieberhaften grippalen Infekt (bis 39°C), uncharakteristischen Beschwerden (Kopf-, Kreuz- und Gliederschmerzen), katarrhalischen und gastrointestinalen Symptomen. Serologie und Liquoruntersuchungen sind zu dieser Zeit nicht diagnoseweisend.
- ein anschliessendes asymptomatisches Intervall von etwa einer Woche (6-10d).

Bei 20-30% der Erkrankten kommt es zur zweiten Erkrankungsphase (Stadium der Organmanifestation) mit einem erneuten Fieberanstieg bis 40°C, schwerem Krankheitsgefühl und Befall des ZNS. Bei 50% der Fälle mit Beteiligung des ZNS manifestiert sich eine isolierte aseptische Meningitis, bei 40% eine Enzephalitis und bei 10% eine Myelitis; häufig präsentieren sich Mischformen wie die Meningoenzephalitis, Meningomyelitis oder -radikulitis. Selten entsteht begleitend eine Hepatitis oder Myokarditis (Krauss et al., 2004).
Die klinische Symptomatik bei der meningitischen Verlaufsform unterscheidet sich nicht wesentlich von anderen viralen Meningitiden, das Allgemeinbefinden ist häufig jedoch stark beeinträchtigt. Im Vordergrund stehen Kopfschmerzen, Fieber und Müdigkeit. Die

Enzephalitis verursacht Bewusstseinsstörungen, Koordinationsstörungen, es werden Lähmungen der Gesichtsnerven beobachtet. In der Regel tritt die Enzephalitis zusammen mit der Meningitis auf. Die Myelitis manifestiert sich primär im Bereich der Vorderhörner und geht daher häufig mit einer schlaffen Lähmung der Extremitäten einher. Da sie häufig in Assoziation mit einer Hirnstammenzephalitis auftritt, finden sich meist auch Schluck- und Sprechstörungen, Lähmungen der Gesichts- und Halsmuskulatur sowie Atemlähmungen (Kaiser und Holzmann 2000).

Es kommt meist zur symptomlosen Rekonvaleszenz nach 2 bis 14 Tagen. Die Meningitis verschwindet meist vollständig, neurologische Residualzustände bleiben bei 20-30% der schwer erkrankten Patienten über lange Zeit oder permanent bestehen. 23% der Patienten leiden häufig mehrere Wochen bis zur Dauer von fünf Jahren nach überstandener Erkrankung unter anhaltenden neurasthenischen Beschwerden (Tendenz zu Kopfschmerzen, Schwächegefühl, vermehrte Müdigkeit, verminderte Belastbarkeit, emotionale Labilität, depressive Verstimmung, Reizbarkeit).

Bei einem Teil der Patienten bestehen ausserdem vorübergehend Störungen der Konzentrations- und Gedächtnisleistungen, Koordinationsstörungen, gelegentlich auch Hörstörungen sowie Lähmungen. In 11% der schweren Erkrankungsfälle manifestiert sich eine Enzephalomyelitis mit Paresen und Paralysen oder eine Meningoenzephalomyelitis.

Die natürliche Infektion hinterlässt eine lebenslange Immunität, unabhängig davon, ob sie klinisch manifest oder inapparent verlaufen ist (Lammli et al., 2000).

Die Letalität aller Verlaufsformen verursacht durch den europäischen Typ des TBEV, liegt bei 1 bis 5 %, die Letalität der Myelitis allein ist zehnfach höher. Nach Infektion durch RSSEV im Fernen Osten liegt die Letalität bei hospitalisierten Fällen zwischen 20 und 30%.

Alle Altersklassen sind betroffen, vor allem Erwachsene mittleren und höheren Alters. Die TBE hat die größte Bedeutung für freizeitexponierte Personen, die sich viel in Wald- und Krautlandschaften bewegen.

Schwere Verlaufsformen werden fast ausschliesslich bei Personen über 50 Jahren gesehen. Bis zum 40. Lebensjahr überwiegen Meningitiden, vom 40. bis 60. Lebensjahr werden vorwiegend Enzephalitiden diagnostiziert, während nach dem 60. Lebensjahr paralytische Verlaufsformen dominieren (Rolle und Mayr 2001). Bei Kindern ist der Verlauf weniger schwerwiegend als bei Erwachsenen. Symptome bei der Enzephalitis sind durchgehend milder, Myelitiden und Radikulitiden sind seltener bei besserer Prognose. Sehr selten entwickeln sich bleibende Schäden.

Das Krankheitsbild der RSSE unterscheidet sich klinisch von der CEE. Die Symptome der Erkrankung entwickeln sich graduell, mit einer schweren grippeähnlichen Prodromalphase, gefolgt von Symptomen wie Halssteifheit, sensorischen Veränderungen, visuellen Störungen und variablen neurologischen Dysfunktionen wie Paresen, Paralysen, Sinnesverlusten,

Konvulsionen. In schwerwiegenden Fällen kommt es zum Tod während der ersten Woche. Die Letalität liegt bei 20%. Im Gegensatz zur CEE ist der Krankheitsverlauf bei Kindern schwerer als bei Erwachsenen. Neurologische Ausfallserscheinungen treten in 30 bis 60% der Überlebenden auf, vor allem Paralysen des Schultergürtels und der Arme.

2.3.1.2. Diagnostik

Wesentlich für die Diagnostik ist zunächst die Anamnese. Wichtig ist die Frage nach einem Zeckenbiss innerhalb der letzten vier Wochen vor Beginn der Symptomatik, wobei der Aufenthalt in einem Endemiegebiet obligat ist (Kaiser 2002). Eine Prodromalphase mit grippeähnlichen Symptomen und Fieber kann bei 70% der Betroffenen beobachtet werden. Typischerweise findet der Diagnostiker einen Patienten vor mit neurologischer Symptomatik. Es gelingt meist der Nachweis von entzündlichen Veränderungen im Blut und Liquor und von spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern gegen TBEV im Blut. Der Genuss von roher Schaf- oder Ziegenmilch ist ebenfalls ein wichtiger Hinweis.
Labordiagnostische Befunde geben Hinweise auf die Erkrankung, denn innerhalb der ersten Erkrankungsphase kommt es zu einer teilweise deutlichen Leukopenie. Diese wird in der zweiten Erkrankungsphase von einer Leukozytose mit mehr als 10.000 Zellen/µl abgelöst. Es findet sich eine deutlich erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit mit über 10 mm in der ersten Stunde und meist eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins. Im Liquor findet sich obligat die für eine Virusinfektion uncharakteristisch hohe Pleozytose mit anfänglichem Vorherrschen von Granulozyten sowie ein erhöhter Eiweissgehalt (Kimming et al., 2000). Fakultativ findet sich eine Störung der Blut-Liquorschranke sowie eine intrathekale Synthese von spezifischen Immunglobulinen der Klassen M, A und G. Im Verlauf der Erkrankung lassen sich im Blut fast immer Antikörper gegen das TBEV nachweisen.
Von den bildgebenden Verfahren ist nur die Kernspinresonanztomographie nützlich. Krankheitstypische Auffälligkeiten, vornehmlich im Thalamus, sind meist erst 3 Tage nach Beginn der zweiten Fieberphase zu finden, allerdings nur bei etwa 20% der Patienten mit Enzephalitis und Myelitis (Alkadhi und Kollias 2000).
Die Diagnose wird üblicherweise durch serologische Tests, vor allem den Nachweis von Antikörpern aus Serum oder Liquor im ELISA oder SNT gestellt, da bereits in der ersten Phase virusspezifische IgM-Antikörper meist nachweisbar sind. Bei einem negativen serologischen Ergebnis empfiehlt sich eine Wiederholung der Untersuchung nach einer Woche. In der zweiten Phase der Erkrankung werden regelmässig sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper gefunden. Mit sensitiven Tests ist es möglich, IgM-Antikörper bis zu 10 Monate nach Infektion nachzuweisen.

Serologische Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Flaviviren limitieren den Wert dieser Methode. In Mitteleuropa kommt es bisweilen zu Fehldiagnosen, da eine Impfung gegen Gelbfieber zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen TBEV führen kann.
Der Virusnachweis im Blut ist nur während der Prodromalphase möglich. In der zweiten Erkrankungsphase kann Virus im Liquor nachgewiesen werden. Der Antigennachweis geschieht durch Virusisolation und Anzucht in Zellkultur oder den Nachweis der viralen Nukleinsäure in einer RT-PCR. Für die Diagnostik akuter Fälle ist die RT-PCR eine geeignete Methode zum Nachweis von Viren in der Zecke oder aus dem Liquor.
Ein negatives PCR-Ergebnis schliesst eine Infektion nicht aus, da zum Zeitpunkt der Probennahme die virämische Phase schon abgelaufen sein kann und auch der Liquorbefund eine Infektion in einem abgegrenzten Gebiet des ZNS nicht immer wiederspiegelt (Kimming et al., 2000).
Die Komplementbindungsreaktion ist wegen ihrer geringen Sensitivität obsolet. Gleiches gilt für den HHT, der aufgrund vielfältiger Probleme nur noch in wenigen Referenzlaboren durchgeführt wird. Bei der Interpretation serologischer Befunde ist zu beachten, dass die Gabe eines Hyperimmunglobulins zu falsch interpretierten positiven IgG-Titern im Serum führen und den Anstieg von IgG- und IgM-Antikörpern verzögern kann. Wichtig zu beachten ist, dass nach der TBE-Impfung Impftiter zu Fehlinformationen führen können (Holzmann 2003).

2.3.1.3. Differentialdiagnosen

Im Prodromalstadium kommen die Influenza und Influenza-ähnliche Erkrankungen, wie auch die Poliomyelitis differentialdiagnostisch in Frage. Im Stadium der Organmanifestation mit Meningoenzephalitis verringert sich das Spektrum auf Erreger, die eine seröse, nichteitrige Meningitis oder Enzephalitis verursachen, wie Mumps-, Masern-, Echo-, Coxsackie-, Herpes- und viele Enteroviren. Auch die Garin-Bujadoux-Bannwarth Meningopolyneuritis (Borrelia garinii) hat einen chronischen Verlauf.
Es gibt verschiedene durch Zecken übertragene Flaviviren, die zum Beispiel im ELISA serologische Kreuzreaktionen bewirken und somit zu einem falsch positiven Befund führen können, wie Dengue- und Gelbfieberviren.

2.3.1.4. Prophylaxe und Therapie

Für die TBE existiert keine virusspezifische Therapie. Es besteht die Möglichkeit, innerhalb von 48 bis 96 h nach einem Zeckenbiss eine passive postexpositionelle Immunisierung mit Gammaglobulinen aus Hyperimmunserum durchzuführen. Das Präparat „FSME-Immunglobulin“ stammt noch aus der Zeit, in der noch keine Impfstoffe gegen FSME verfügbar waren. Damals wurde das Präparat nicht geimpften Personen nach Zeckenstich in einem TBE-Risikogebiet verabreicht. Dabei zeigte sich, dass es nach Gabe von FSME-Immunglobulin in ca. 60 bis 70% der Infektionen nicht zur Erkrankung kam, wobei auch ohne Therapie ca. 60% der Infektionen mit Feldvirus (TBEV-W) inapparent verlaufen. Es gibt allerdings auch Einzelbeobachtungen, wonach bei Personen, die trotz FSME-Immunglobulin eine TBE bekamen, die Infektion besonders schwer verlief. Es wurde vermutet, dass in diesen Fällen das Immunglobulin nicht nur die Erkrankung nicht verhinderte, sondern sogar einen besonders schweren Verlauf provozierte. Dies führte schliesslich zur Empfehlung des österreichischen Gesundheitsministers, bei ungeimpften Kindern nach Zeckenstich auf das FSME-Immunglobulin zu verzichten (Hofmann 1999).

Da es keine spezifische antivirale Therapie gibt, bleibt nur die unterstützende, symptomatische Therapie. Die Anwendung von steroidalen Antiphlogistika wird unter dem Aspekt der Immunsuppression nicht empfohlen, da sie den Krankheitsverlauf verlängert (Kaiser 2002). Die Verabreichung von nichtsteroidalen Antiphlogistika erfolgt jedoch meist bei der Behandlung von auftretenden Kopfschmerzen mit Präparaten wie Paracetamol oder Metamizol. Bei hartnäckigen Kopfschmerzen können auch Antiphlogistika wie Diclofenac oder Ibuprofen eingesetzt werden. Bei etwa 5% der Patienten ist wegen einer Atemlähmung oder schweren Bewusstseinsstörung eine Behandlung auf der Intensivstation notwendig. Bestimmte neurologische Funktionsstörungen erfordern krankengymnastische, ergotherapeutische und gelegentlich auch logopädische Behandlungsmassnahmen. Bei etwa 20% der Patienten sind längerfristige Rehabilitationsmassnahmen erforderlich. Die Dauer der Akutbehandlung in einer Klinik beträgt im Mittel 10 Tage, bei einer Meningoenzephalitis ca. 15 Tage und bei einer Meningoenzephalomyelitis ca. 70 Tage.

Die aktive Immunisierung schützt vor Erkrankungen durch alle drei Subtypen des TBEV. Derzeit (Stand 2004) bieten sich in Deutschland als Langzeitprophylaxe inaktivierte Impfstoffe an, die u.a. eine immunogene Komponente der Virushüllmembran enthalten.

Es gibt zur Zeit zwei Firmen auf dem deutschen Markt, die Impfstoffe zur Anwendung beim Menschen anbieten. Die Firma Baxter vertreibt die Impfstoffe „FSME Immun Neu“ und „FSME Immun Junior“. Es handelt sich hierbei um eine Weiterentwicklung des früheren Impfstoffes „FSME Immun Inject“, der bis zum Jahr 1999 im Handel war. Das neu

entwickelte Produkt enthält als Zusatzstoff (Stabilisator) Humanalbumin. Die Erwachsenendosis beträgt 2,4 µg TBE-Virusantigen, die Kinderdosis die Hälfte.
Die Firma Chiron-Behring bietet die Impfstoffe „Encepur Erwachsene“ und „Encepur Kinder“ an. Die neue Generation der Impfstoffe 2002 enthält wegen der allergenen Potenz kein Polygelin mehr als Stabilisator, sondern Saccharose in geringen Mengen. Die Impfstoffdosis für einen Erwachsenen beträgt 1,5 µg TBE-Virusantigen, die Dosis für Kinder ebenfalls nur die Hälfte. Für diesen Impfstoff liegen Verträglichkeitsstudien von mehr als 6.600 Versuchspersonen aus kontrollierten klinischen Studien vor. Impfkomplikationen wurden nicht beobachtet.
Die Erstimmunisierung umfasst drei Teilimmunisierungen, von denen die ersten zwei Impfungen im Abstand von 1-3 Monaten und die dritte Impfung nach 9-12 Monaten appliziert werden. Für „Encepur“ ist ebenfalls ein „Schnellimmunisierungsschema“ zugelassen. Es wird an den Tagen 0, 7 und 21 und erneut nach 12-18 Monaten geimpft. Kinder unter einem Jahr sollten nur bei zwingender Indikation geimpft werden, wobei die unterste mögliche Altersgrenze mit 6 Monaten angegeben wird. Nach vollständiger Grundimmunisierung ist bei 99% der Geimpften mit vollständigem Schutz zu rechnen. Die Impfung schützt für mindestens 3 Jahre; junge Menschen bauen eine bessere und längere Immunität auf als Senioren. Es wird zur Revakzinierung alle 3 Jahre geraten. Hat ein Impfling bereits einige Auffrischungen erhalten, hat er eine solide, langanhaltende Immunität, so dass die Intervalle verlängert werden können. Untersuchungen am Institut für Virologie der Medizinischen Universität Wien haben gezeigt, dass versäumte Auffrischungsimpfungen auch noch nach langer Zeit problemlos nachgeholt werden können. Ein Intervall bis zu 8 Jahren kann toleriert werden. Es sollte jedoch eine Kontrolle des Antikörperspiegels durchgeführt werden. Beide Impfstoffe sind gut verträglich, allerdings kann es nach der Impfung zu einer Fieberphase kommen.
Gemäss der ständigen Impfkommission (StIKo) gelten für die TBE-Impfung folgende Empfehlungen: die sogenannte „Reiseimpfung“ für Personen, die Aufenthalte in TBE-Risikogebieten ausserhalb Deutschlands planen und die „Indikationsimpfung“ für Personen in Deutschland, die sich in TBE-Risikogebieten aufhalten und besonders für diejenigen, die durch TBE beruflich gefährdet sind (z.B. Forstarbeiter, Exponierte in der Landwirtschaft, exponiertes Laborpersonal) (Demichelli et al., 2000).

2.3.2. TBE in der Tiermedizin

Im Jahre 1972 wurde in der Schweiz, im Kanton Schaffhausen, erstmals TBEV aus dem Hirn eines erkrankten Hundes isoliert (Wandeler et al., 1972). Im selben Jahr veröffentlichten Gresikova et al. eine Studie, in der Hunde mit virustragenden Zecken infiziert wurden (Gresikova et al., 1972a). Es folgte eine Lokalisierung von Zecken-TBE-Naturherden in mehreren Kantonen in der Schweiz. TBEV wurde in Zecken und Wildmäusen nachgewiesen (Matile et al., 1979).
1981 gelang Waldvogel et al. zum ersten Mal der Nachweis von TBE-Virus aus dem Gehirn eines an Enzephalitis erkrankten Pferdes (Waldvogel et al., 1981). Die umfassendsten Daten über TBEV-Infektionen bei Tieren liegen für Hunde vor.

2.3.2.1. TBE beim Hund

Der erste Fall einer klinischen TBE beim Hund wurde 1972 in der Schweiz, in Hallau, Schaffhausen von Gresikova dokumentiert (Gresikova et al., 1972a). Aus dem Gehirn eines Hundes mit akuten ZNS Symptomen konnte Virus isoliert werden, welches im HHT als TBEV charakterisiert wurde.
Gresikova führte weiterhin eine experimentelle Infektion an sechs Hundewelpen durch (Gresikova et al., 1972b). Die Welpen wurden mittels infizierter Zecken oder direkt subkutan mit dem Virus infiziert. Es kam zur Serokonversion, aber nicht zur Erkrankung der Welpen. Sie zeigten keine Erhöhung der Körpertemperatur und keine anderen klinischen Symptome. Eine virämische Phase wurde zwischen dem 1. und 7. Tag post infektionem (p.i.) nachgewiesen. Der höchste Ak-Titer entwickelte sich zwischen der 4. und 5. Woche p.i.. Virus konnte weder aus dem ZNS noch aus inneren Organen oder aus dem Speichel isoliert werden. Histologisch konnten keine Veränderungen gefunden werden. Gresikova schliesst daraus, dass bei Hunden in den meisten Fällen inapparente Infektionen vorliegen.
Im Oktober 1993 erschien aus dem Institut für Tierneurologie der Universität Bern die erste klinisch-neurologische Studie beim Hund (Tipold und Jaggy 1993). Tipold berichtete von fünf TBE Fällen bei Hunden in einem Schweizer Endemiegebiet. Alle starben oder wurden wegen schlechter Prognose euthanasiert. Sie vermutete, dass beim Hund eine geringere Neuroinvasivität als beim Mensch vorliegt, da es zu einer schnellen Eliminierung des Virus durch das Immunsystem kommt. Weiter konnte Tipold bei acht Hunden, die wegen Tollwutverdacht euthanasiert wurden, eine Infektion mit TBEV nachweisen (Tipold et al., 1993). Sie schliesst daraus, dass die Erkrankung häufiger auftritt als sie diagnostiziert wird.

Aus Deutschland wurde 1997 ein erster Fallbericht in München aus der Abteilung für innere Medizin der Universität München von Reiner vorgestellt (Reiner und Fischer 1998).
Müller veröffentlichte 1997 eine seroepidemiologische Studie zur TBE beim Hund in Süddeutschland und der Schweiz. Er entwickelte einen ELISA, da er andere Testmethoden, wie die KBR und den HHT als nicht sensitiv genug einschätzte und ausserdem eine Differenzierung der IgM und IgG Antikörper anstrebte (Müller 1997).
Der ELISA diente zum Nachweis von Antikörpern gegen TBEV und war folgendermassen aufgebaut: inaktiviertes an die Festphase gebundenes TBEV wird als Antigen genutzt und mit den Serum- oder Plasma-Proben in einer Verdünnung von 1:26 für 90 Minuten inkubiert. Nach einem 5fachen Waschzyklus wird TBEV Antigen-Peroxidase Konjugat zugesetzt. Diesem Schritt folgt ein weiterer 5facher Waschzyklus und eine Substratreaktion, bei der TMB als Chromogen genutzt wird. Die Messung der Extinktionswerte erfolgt bei 450nm mit einem Mikroplatten Photometer. Es wurden 512 Seren von Hunden getestet, die Tierärzte als Verdachtsfälle für eine TBEV Infektion einsandten. In 117 Seren (23%) konnten Antikörper gegen TBEV nachgewiesen werden. Müller stellte eine Liste von Leitsymptomen auf, anhand derer die Hunde in drei Gruppen eingeteilt wurden: Gruppe 1 (27 Hunde): TBE sehr wahrscheinlich, alle Leitsymptome sind vorhanden; Gruppe 2 (31 Hunde): TBE wahrscheinlich, mehr als ein Leitsymptom ist vorhanden, jedoch keine ZNS-Symptomatik; Gruppe 3 (59 Hunde): TBE möglich, lediglich unspezifische Symptome können beobachtet werden.
Weiterhin startete Müller einen Impfversuch bei 19 Hunden mit dem Humanimpfstoff FSME-Immun der Firma Immuno GmbH, Heidelberg. Alle Hunde serokonvertierten innerhalb der ersten 4 Wochen nach der ersten Immunisierung und entwickelten einen stabilen Antikörpertiter, es wurden keine Nebenwirkungen der Vakzination festgestellt.
Weissenböck und Holzmann führten 1997 den TBE Nachweis bei vier Hunden mit neurologischen Symptomen post mortem mittels immunhistochemischer Untersuchung (Weissenböck und Holzmann 1997). Sie äusserten den Verdacht, dass die meisten Infektionen subklinisch verlaufen. Wenn es jedoch zur manifesten Erkrankung kommt, dann verläuft sie schwerwiegend.
Reiner und Fischer beschrieben vier TBE-Fälle bei Hunden, bei zwei dieser Tiere kam es zur Ausheilung (Reiner et al., 1999).
Kirtz beschrieb 1999 die häufigsten klinischen Symptome bei an TBE erkrankten Hunden (Leschnik et al., 2002). Bei der Hälfte der seropositiven Tiere fand er eine symptomfreie Durchseuchung.
Klimes et al. berichteten 2001 von drei Fällen beim Hund mit hohen TBE-Titern in ELISA und klinischen Symptomen einer Meningoenzephalitis oder Enzephalitis in Tschechien (Klimes et al., 2001).

Übereinstimmende klinische Befunde der zuvor genannten Autoren sind folgende:

- In allen Fällen wurde von einer akuten, progressiven Entstehung der Symptomatik berichtet. Der in der Humanmedizin als typisch beschriebene biphasische Verlauf zu Beginn der Erkrankung wurde bei den betroffenen Hunden nicht beobachtet.
- Regelmässig berichtet wurde von einer Erhöhung der Körpertemperatur, Apathie, Schwäche, gestörtem Allgemeinbefinden und Anorexie.
- Mitunter wurden Schreckhaftigkeit, Speicheln, erhöhte Erregbarkeit und Verhaltensveränderungen bis hin zu Aggressivität beschrieben.
- In schweren Fällen wurden Symptome beobachtet wie Vorhand- oder Nachhandschwäche, Gleichgewichtsstörungen, generalisierte Ataxie, Hypermetrie, Manegebewegungen, Myoklonus, Exzitationen, Spasmen, Zitterkrämpfe, Paresen, Paralysen, Hemiplegien, Tetraplegie, Tetraparesen bis hin zum Festliegen in Seitenlage mit verkrampfter Streckstellung der Beine, Ophisthotonus und Torticollis. Mitunter waren epileptiforme Anfälle durch äussere Reize auslösbar.
- In wenigen Fällen wurden zusätzlich Hypo- oder Hyperalgesie entlang der gesamten Wirbelsäule, meistens im Bereich der Halswirbelsäule und im Kopfbereich, sowie Hypersensibilität im Bereich der Haut dokumentiert. Manche Tiere zeigten Kopfschiefhaltung und hatten in der neurologischen Untersuchung folgende Kopfnervenbefunde: regionale Hyposensibilität, Paresen, Hypo- und Areflexie, vestibulärer Strabismus, rotatorischer Nystagmus, Miosis, Anisokorie.

Kirtz teilt den Krankheitsverlauf ein in einen perakut letalen, akuten bis subakuten und chronischen Verlauf (Leschnik et al., 2002). Beim perakut letalen Verlauf starben die Tiere in drei bis maximal sieben Tagen nach Beobachtung der ersten Symptome oder wurden euthanasiert. Beim akuten Verlauf liegt die Krankheitsdauer zwischen einer bis drei Wochen. In seinen Studien kommt es bei allen akut erkrankten Tieren zur Heilung. Beim chronischen Verlauf dauert die Erkrankung drei Monate bis zu einem halben Jahr, bis sie schliesslich ausheilt.

Beim lebenden Tier kann die Verdachtsdiagnose gestellt werden aufgrund von:

- anamnestischen Daten, wie Aufenthalt des Patienten in einem Endemiegebiet, Zeckenexposition, Fieberphasen, jahreszeitliches Auftreten der Erkrankung
- Befunden der klinischen Untersuchung, die auf eine ZNS-Symptomatik hinweisen
- Nachweis von Antikörpern gegen TBEV im Serum und insbesondere im Liquor. Eine Serokonversion innerhalb von 4-6 Wochen erhöht die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung.

Als beweisend für die Infektion mit TBEV gelten der Nachweis von viraler Nukleinsäure des TBEV mittels PCR oder IF und die direkte Virusisolierung aus dem ZNS, wie sie Wandeler durchgeführt hat. (Wandeler et al., 1972).
Postmortal können Ergebnisse der pathohistologischen Untersuchung die Diagnose erhärten. Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen zählen Staupe, Borreliose und Tollwut.

2.3.2.2. TBE bei Wiederkäuern

Bei Wild- und Hauswiederkäuern kommt es nach natürlicher oder experimenteller Infektion zur Virämie ohne Ausbildung einer TBE-spezifischen Symptomatik. Als weniger empfängliche Tiere ähnlich den Nagetieren sind sie eingebunden in den natürlichen Übertragungszyklus des TBEV zwischen Vektor und stärker empfänglichen Vertebraten. Virusfreie Zecken infizieren sich beim Saugakt am virämischen Tier (Rolle und Mayr 2001).
Von Bedeutung ist dies für die Infektionssituation beim Menschen. Wiederkäuer infizieren sich durch Zeckenbiss mit TBEV, bleiben jedoch klinisch unauffällig, so dass die Infektion unentdeckt bleibt. Diese Tiere scheiden in der Phase der Virämie Virus in der Milch aus, wenn auch nur über kurze Zeit und in geringen Konzentrationen und können so zur Infektionquelle für den rohmilchkonsumierenden Menschen werden. In einem südwestdeutschen Endemiegebiet führte Rieger Studien zur Übertragung von TBE und Erkrankung durch Konsum von Rohmilch durch (Rieger et al., 1997). Es wurden 661 Personen untersucht. Der Konsum von Rohmilch beeinflusste die TBE-Infektions- und Erkrankungsrate nur in geringem Maße, spielte jedoch eine grössere Rolle als z.B. Freizeitaktivitäten. Lediglich die Ausübung von Jagd und Forstwirtschaft hatte einen deutlichen Effekt.
Eine weitere Flavivirusinfektion mit zentralnervösen Erscheinungen beim Wiederkäuer, insbesondere beim Schaf, ist Louping ill. Die Abgrenzung von der TBEV-Infektion gestaltet sich labordiagnostisch schwierig. Eine Differenzierung ist durch Prüfung der Empfänglichkeit verschiedener Zellkulturen und den Nachweis von Antigen möglich (Rolle und Mayr 2001).

2.3.2.3. TBE bei Pferden

Zur TBE Erkrankung von Equiden gibt es in der Fachliteratur bis zum heutigen Zeitpunkt leider nur spärliche Angaben. Im 1999 erschienenen Fachbuch für Pferdekrankheiten: Handbuch Pferdepraxis von Dietz und Huskamp werden Enzephalitiden durch Flaviviren aufgeführt. Es wird über Japanische Pferdeenzephalitis (JE), West Nile Fever, die St.-Louis-Enzephalitis und die Murray-Valley-Enzephalitis berichtet. Die durch Zecken übertragene TBE beim Pferd wird hier nicht erwähnt (Dietz und Huskamp 1999).

Die erste Dokumentation einer klinisch manifesten akuten TBE beim Pferd stammt von Waldvogel (Waldvogel et al., 1981). Er diagnostizierte diese Erkrankung bei einer vierjährigen Welshponystute mit schweren zentralnervösen Symptomen. Sie zeigte akute zentralnervöse Symptome, wie Seitenlage, Streckkrämpfe, Zähneknirschen, Zittern, Fieber (38,6°C). Über drei Tage waren Ataxie, Mydriasis und auslösbare epileptiforme Anfälle in Intervallen von 6-8 Stunden zu beobachten. Zwischen den Anfällen gab es symptomfreie Phasen, in denen die Stute guten Appetit hatte und nur einen unsicheren Gang zeigte. Waldvogel beschreibt weiterhin partielle Lähmungen der Hals- und Schultergürtelmuskulatur. Am vierten Tag nach Beginn der zentralnervösen Symptomatik wurde das Tier euthanasiert.

Es gelang eine Isolation von TBEV aus der nasalen Hälfte der linken Grosshirnhemisphäre. Das Isolat wurde in Zellkultur angezüchtet und der Überstand an Babymäuse intracerebral verimpft. Bei den Mäusen traten am dritten Tag p.i. Lähmungserscheinungen auf. Im SNT und HHT konnten aus Blut der Mäuse Antikörper gegen TBEV isoliert werden. Die pathomorphologischen Befunde entsprachen dem Bild einer virusbedingten nichteitrigen Meningoenzephalitis. Entzündliche Veränderungen konnten in allen Regionen des Gehirns gefunden werden. Sie waren örtlich schwer ausgeprägt, wobei die Kleinhirnrinde am stärksten betroffen war. In den betroffenen Gebieten fielen dichte vaskuläre und perivaskuläre Infiltrate von Lymphozyten und Monozyten auf und zwar sowohl in der grauen als auch in der weissen Substanz. Im Kleinhirn trat Purkinjezelldegeneration mit Neuronophagie deutlich in Erscheinung. Die Leptomeninx zeigte hier eine massive perivaskuläre Infiltration.

Grabner beschrieb ein Pferd mit der Symptomatik einer Kleinhirnenzephalitis mit hochgradiger Ataxie und Koordinationsstörungen (Grabner 1993). In Serum und Cerebrospinalliquor wurden Antikörper gegen TBEV nachgewiesen.

Luckschander testete in der Zeit vom Dezember 1995 bis Februar 1998 469 Pferdeseren aus ganz Österreich sowie Liquor cerebrospinalis von sechs Pferden mittels kompetitivem ELISA der Firma Immuno (Luckschander 1998). Die positiven Ergebnisse wurden im SNT überprüft. Sechzig Pferdeseren (13%) führten in beiden Tests zu einem positiven Resultat. Acht der 60

serologisch positiven Pferde zeigten klinische Symptome. Diese Tiere hatten alle Koppelgang. Sieben Pferde mit klinischen Symptomen erkrankten während der Sommermonate. Es konnte weder eine Alters- noch eine Geschlechtsdisposition festgestellt werden. Es wurde eine Häufung der Seroreagenten in den Frühjahrs- und Sommermonaten festgestellt. Die von Waldvogel (1981) beschriebenen schweren neurologischen Ausfallserscheinungen konnten bei zwei Pferden beobachtet werden. Bei einem Pferd deuteten der klinische Verlauf, der positive serologische Titer, die negativen Ergebnisse der differentialdiagnostischen Untersuchungen und die Ergebnisse der neuropathologischen Untersuchung auf eine akute TBE-Erkrankung hin. Dieses Tier wurde mit Kreisbewegungen und tonisch-klonischen Krämpfen dem Tierarzt vorgestellt. Die blutchemische Untersuchung ergab ein unauffälliges rotes und weißes Blutbild und eine Erhöhung der Creatinkinase. Im Liquor cerebrospinalis wurde eine zweifach positive Pándyreaktion als Zeichen einer entzündlichen Reaktion im ZNS und eine erhöhte Zellzahl (1300/µl) festgestellt. Im Serum waren keine Antikörper gegen Herpesviren oder Borrelioseerreger nachzuweisen. Eine Tollwut- oder Bornavirusinfektion wurde ausgeschlossen. Die Untersuchung auf anti-TBEV Antikörper ergab im Serum ein positives und im Liquor ein negatives Ergebnis.

Das Pferd hatte in der neuropathologisch-histologischen Untersuchung des Mes- und Metencephalons und der Medulla oblongata folgende Befunde: eine nichteitrige Meningoenzephalitis mit perivaskulären Infiltraten, Ganglienzellnekrose und Gliaknötchen. Das zweite Pferd war auf der Koppel zwischen zwei Bäumen festhängend gefunden worden und verstarb. Im Serum waren Antikörper gegen TBEV nachzuweisen. Antikörper gegen EHV- und Bornavirus konnten nicht detektiert werden. In der blutchemischen Untersuchung wurde eine deutliche Erhöhung der Leber- und Nierenwerte, ein erhöhter Hämatokrit und eine Leukozytose festgestellt.

Von den restlichen sechs Pferden zeigte eines Kolik, eines „Chronic Obstructive Pulmonary Disease“, vier Pferde Ataxie. Eines der ataktischen Pferde litt unter einer nur geringgradigen Ataxie und Zusammenbrechen. Luckschander berichtet von weiteren Symptomen wie Inappetenz, Schreckhaftigkeit, Kreisbewegungen, verminderter Hautelastizität, Apathie und Stupor.

Die Studie von Janitza, in der 205 Pferde im Raum Bodensee auf TBE untersucht wurden, ergab eine Seroprävalenz von 23,4 % (Janitza et al., 2002). In dieser Studie zeigten sich signifikante Zusmmenhänge zwischen Ort, Haltung, Weidegang sowie Altersgruppe und dem Anteil seropositiver Tiere. Der Aufenthalt im westlichen Teil des Untersuchungsgebietes, reine Koppelhaltung und häufiger Weidegang erhöhten die Wahrscheinlichkeit für Seropositivität eines Individuums mit zunehmendem Alter. Zur Diagnostik der Proben wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA (Labor Alomed, Radolfzell) verwendet, stichprobenartig wurden die Ergebnisse durch einen Neutralisationstest (Baxter-Immuno, Orth a.d. Donau,

Österreich) überprüft. In dieser Studie wurden bei den seropositiven Pferden keine Symptome beobachtet, die Hinweise auf eine Erkrankung an TBE geben könnten.

Da nur die zwei Publikationen von Waldvogel und Luckschander Hinweise geben zur klinischen Symptomatik einer TBE Erkrankung beim Pferd, können lediglich zusammenfassend folgende von den Autoren übereinstimmend publizierten Symptome als wahrscheinlich charakteristisch für den schweren Verlauf der TBE beim Pferd angegeben werden:

- deutlich gestörtes Allgemeinbefinden,
- erhöhte Körpertemperatur und Pulsfrequenz,
- Zittern,
- Zähneknirschen,
- Ataxie,
- Krämpfe.

Die Farbe der Schleimhäute wurde als leicht gelblich bis gerötet beschrieben, die kapilläre Rückfüllzeit als verzögert. In besonders schweren Fällen wurden intervallartige epileptiforme Anfälle beschrieben, die durch Stress ausgelöst werden konnten. Beschrieben wurden tonisch-klonische Krämpfe bis zu reinen Streckkrämpfen aller Gliedmaßen mit einer Dauer von ein bis zwei Minuten. Aufgrund der Intensität der in immer kürzeren Intervallen auftretenden Krampfanfälle wurden diese Tiere euthanasiert.
In der Pathohistologie findet man bei an TBE erkrankten Tieren eine nichteitrige Meningoenzephalitis und -radikulitis, besonders das Kleinhirn ist betroffen. Die entzündlichen Veränderungen der Grosshirnhemisphere sind charakterisiert durch vaskuläre und perivaskuläre Lymphozyten- und Monozyteninfiltrate. Im Kleinhirn sieht man eine Purkinjezelldegeneration und Neuronophagie. In der Leptomeninx finden sich besonders massive perivaskuläre Infiltrationen (Waldvogel et al., 1996; Luckschander 1998; Janitza et al., 2002).
Beim chronischen Verlauf der vermutlich an TBE erkrankten Pferde berichtet Luckschander von weniger schwer ausgeprägten neurologischen Symptomen, die sich innerhalb weniger Wochen bis hin zu einigen Monaten stetig besserten, um dann zum Teil vollständig zu verschwinden (Luckschander 1998). Bei diesen Tieren beobachtete sie geringgradige Schwäche der Hinterhand, Schweifschiefhaltung und gering verzögerte Stell- und Haltungsreflexe. Die Antikörpertiter dieser Pferde sanken bis unter die Nachweisgrenze ab. Es wurde in diesen Fällen keine weitere für die TBEV-Infektion als beweisend geltende Diagnostik durchgeführt. Es ist unklar, ob bei der Spezies Pferd dieselben Symptome vorkommen wie beim Menschen oder beim Hund.

Labordiagnostische Befunde

Waldvogel berichtet von einer geringgradigen Erhöhung der Muskelenzyme Kreatininkinase und AST. Die hämatologische, blutchemische und auch die Liquoruntersuchung ergab in seinem Fall keine Abweichungen. Grabner beschreibt Befunde in der Liquoruntersuchung wie eine mononukleäre Pleozytose und eine Hyperproteinämie. Luckschander fand bei einem Fallbericht ebenfalls abweichende Befunde bei der Liquoruntersuchung (positive Pandyreaktion, erhöhte Zellzahl). Sie berichtet weiterhin in einem Fall von einer Erhöhung der Leberenzyme, erhöhten Kreatinin- und Harnstoffwerten, Leukozytose, erhöhtem Hämatokrit und verlängerter Gerinnungszeit. In einem anderen Fall fand sie eine erhöhte Serumkreatinase mit unverändertem roten und weissen Blutbild. Im vierten Fall berichtet sie von einer isolierten Erhöhung der Kreatininkinase.

Diagnosestellung

Wesentlich für die Diagnostik der TBE-Erkrankung ist die Anamnese: der Aufenthalt in einem Endemiegebiet ist obligat. Die sichere Diagnosestellung dieser meist klinisch inapparent verlaufenden Erkrankung erweist sich intra vitam als problematisch, da der Nachweis von Antikörpern im Serum nur auf eine Infektion, nicht jedoch auf eine Erkrankung schliessen lässt. Die einfachste Nachweismethode zum Nachweis einer Infektion mit TBEV ist der Antikörper-Nachweis im Blut, wobei im Falle einer Serokonversion innerhalb von 3 bis 4 Wochen eine akute TBEV-Infektion als wahrscheinlich gilt. Der Nachweis von anti-TBEV Antikörpern im Blut erlaubt zwar durch die Höhe und den Verlauf des Titers eine gewisse Aussage über die Aktualität der Infektion mit TBEV, jedoch kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass bei Vorhandensein von anti-TBEV-Antikörpern das TBEV Verursacher einer Erkrankung mit zentralnervöser Symptomatik ist.

Eine höhere diagnostische Sicherheit für den Nachweis der Erkrankung bietet der Antikörpernachweis aus dem Liquor, eine Methode, die beim Pferd jedoch recht selten durchgeführt wird, da die Liquorgewinnung für den Patienten ein relativ grosses Risiko darstellt.

Der sichere Nachweis einer akuten TBEV-Infektion und Erkrankung lässt sich beim lebenden Tier nur im Stadium der Virämie führen, wenn z.B. mittels RT-PCR der Nachweis des viralen Genoms aus Blut oder Liquor gelingt und zusätzlich eine charakteristische klinische Symptomatik vorliegt. Die Erkrankung beim Menschen zeichnet sich durch eine nur sehr kurze Phase der Virämie in der ersten Phase der Erkrankung aus, die gekennzeichnet ist durch unspezifische grippeähnliche Symptome. Davon ausgehend, dass die Verhältnisse beim Pferd grundsätzlich ähnlich sind, ist das Auftreten charakteristischer Symptome in der

Phase der Virämie ist nur bei perakuten Erkrankungsfällen zu erwarten. Daher kann die PCR nicht als Mittel der Wahl für die Diagnose der TBE angesehen werden.
Differentialdiagnostisch kommen alle Krankheitsbilder in Frage, die mit einer zentralnervösen Symptomatik einhergehen, wie Borna Disease, West Nile Fever, Equine Herpes Virus Enzephalitis, Listeriose, Leptospirose, Botulismus, Tollwut, Tetanus und verschiedene Vergiftungen.

Prophylaxe und Therapie
Als prophylaktische Massnahme der Wahl gilt das Bestreben, die Übertragung des Erregers zu verhindern. Dies wird durch verschiedene Massnahmen erreicht wie gezielte Auswahl zeckenarmer Weideflächen, kontinuierliches Kurzschneiden vom Gras, regelmässiges Absammeln der Zecken vom Pferdekörper und Auftragen von Repellents.
Es ist keine Impfung für das Pferd zugelassen. In Österreich wird die Impfung von Hunden mit dem Humanimpfstoff „FSME Immun neu“ der Firma Baxter nach Einverständniserklärung des Besitzers praktiziert. Die therapeutischen Massnahmen beschränken sich wie in der Humanmedizin auf eine rein symptomatische Therapie.

2.3.3. Übertragungswege und Vektoren

2.3.3.1. Übertragungszyklus

Die TBE-Viren zirkulieren in der Natur zwischen Arthropoden und wildlebenden Vertebraten, die als Wirte fungieren. Die Zecke als Vektor überträgt das Virus von Vertebraten als Donor auf die Rezipienten (Blastovic 1958).
Die Erkrankung tritt in Naturherden auf, charakterisiert durch die ökologischen Habitate der Zecken. Es wird nur eine sehr geringe Variation in der geographischen Ausbreitung der Naturherde beobachtet. Die Intensität der Übertragung variiert von Jahr zu Jahr. Dem Anstieg der Populationen an kleinen Säugern, den primären Wirten der immaturen Zecken, folgen ein bis zwei Jahre später ansteigende Zeckenpopulationen. Somit steigt das Infektionsrisiko für Menschen, Tiere und Zecken.
Die Zecken benötigen in der Regel eine hohe Luftfeuchtigkeit von wenigstens 70% und Temperaturen über 10°C um aktiv zu werden. Diese Wetterbedingungen finden sich in unseren Wäldern vorwiegend im Frühsommer und im Herbst. Die Aktivität der Zecken ist stark witterungsabhängig. Auch in warmen Wintern wurden aktive Zecken beobachtet. Darüberhinaus führt ein milder Winter dazu, dass die Zeckenpopulationen und deren Aktivität im folgenden Frühjahr auf besonders hohem Niveau beginnen (Baumhackl 2004).

Ein derartiges Mikroklima findet sich hierzulande in Wäldern mit viel Unterholz und einer ausgeprägten Krautschicht, ebenso an Waldrändern sowie in Busch- und Farnlandschaften. Besonders stark vertreten sind Zecken wegen der höheren Luftfeuchtigkeit in Flusstälern. Je nach Umweltbedingungen sind sie noch in Höhen bis zu 2000 Metern anzutreffen (Kimming et al., 2000).

Nach Kimming et. al. befinden sich in Zecken-Biotopen die Zecken-Entwicklungsstadien und die geschlechtsreifen Tiere in unterschiedlichem Abstand vom Boden. Die feuchtigkeitsbedürftigen Larven befinden sich direkt am Boden bis zu einer Höhe von ca. 10 cm. Hier finden sie auch ihre bevorzugten Wirte, wie kleine Nager. Die Nymphen steigen höher an den Pflanzen empor. Sie finden sich in einer Höhe von 10 bis 50 cm und gelangen an grössere Tiere, wie Igel, Eichhörnchen oder Vögel, aber auch schon an grosse Säugetiere und den Menschen. Die Adulten klettern bis in eine Höhe von einem Meter in der Vegetation. Dort befallen sie Tiere wie Rehwild, Haustiere und den Menschen. In noch grösseren Höhen, wie etwa auf Bäumen, sind Zecken nicht anzutreffen.

Als Infektionsquelle für die als Hauptüberträger fungierenden Zecken kommen wildlebende Nagetiere wie Wald-, Hasel- und Feldmaus in Betracht, wobei das Virus bei entsprechender Populationsdichte von Zecken und Mäusen in einem natürlichen Zyklus zwischen Vektor und Vertebraten zirkulieren und einen echten Naturherd bilden kann. Diese bleiben zunächst unbemerkt, da der Gesundheitsstatus der Nager von den Infektionen nicht beeinträchtigt wird, Nagetiere machen also eine inapparente Infektion durch. Geraten jedoch weniger angepasste Wirte wie Haustiere oder der Mensch in derartige Infektionskreisläufe, kommt es zu Erkrankungen, wodurch die Existenz solcher Naturherde offenbar wird. Zecken werden durch die Krankheitserreger nicht geschädigt und bleiben zeitlebens infiziert. Die Viren rufen bei den Zecken systemische Infektionen hervor, die zum Befall nicht nur der Speicheldrüsen, sondern auch der Eierstöcke führt. Aus diesem Grund können bereits die Eier Krankheitserreger enthalten, die zur bleibenden Infektion der sich daraus entwickelnden Zeckenstadien führt. Diese transovariellen Infektionen kommen jedoch nur in ca. 1% der Fälle vor.

Die noch nicht bereits transovariell infizierte Preimago-Zecke kann sich durch das Blutsaugen an kleinen Säugern mit dem TBEV infizieren und transportiert das Virus von nun an transstadial bis in das adulte Stadium. Die transstadiale und transovarielle Übertragung wurde bei Ixodes-, Dermacentor- und Haemaphysalisspezies demonstriert.

Nach Mehlhorn existieren drei Lebenszyklen der Art Ixodes ricinus: Adulte vollgesogene Weibchen legen Eier ab, die als Gelege verklebt werden (Mehlhorn und Mehlhorn 1996). Nach ca. drei Wochen schlüpfen sechsbeinige Larven, die vor allem auf kleinen Säugetieren Blut saugen. Die Häutung zur achtbeinigen Nymphe erfolgt am Boden; die Zeckennymphe befällt grössere Säugtiere. Nach einer Blutmahlzeit von zwei bis sieben Tagen erfolgt die

Häutung und Entwicklung zur adulten Zecke (2-8 Monate); im Frühjahr werden von den adulten Zecken grössere Säugetiere wie auch der Mensch als Wirte aufgesucht. Die Weibchen saugen 5-14 Tage.

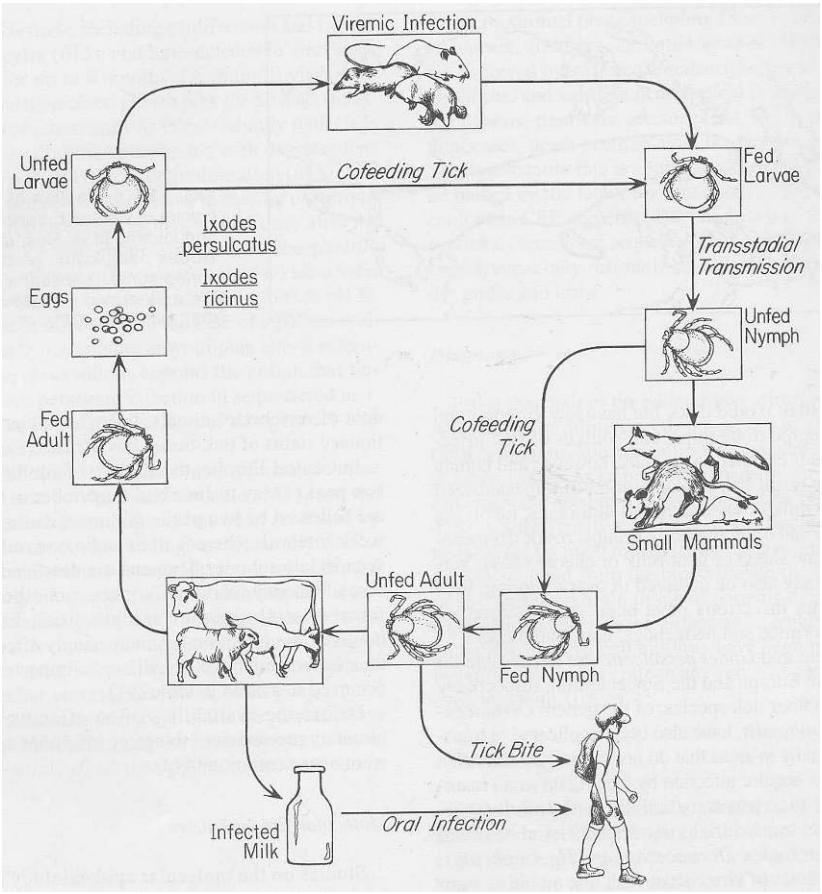

Abbildung 2: Lebenzyklus der Zeckenart I. ricinus und Übertragungszyklus des TBEV (Lindenbach et al., 2001).

Insektivoren, wie z.B. Igel, Marder, Dachse mit im Gegensatz zu Nagetieren relativ stabilen Populationen scheinen wichtige Reservoire zu sein. Grosse Säugetiere, wie Ziegen, Schafe und Kühe sind wichtige blutliefernde Wirte für adulte Zecken, haben aber niedrige Virustiter im peripheren Blut und scheinen daher keine wichtigen Quellen zur Infektion der Zecken zu sein. Verlängerte virämische Infektionen konnten demonstriert werden bei Nagetieren, die Winterschlaf halten, wie Igel und Fledermäuse. Der Mensch spielt die Rolle eines sogenannten „dead end host“, was bedeutet, dass er in der Regel nicht zur Verbreitung der Viren beiträgt. Vermutlich spielen weitere Wildtierarten bei der Verbreitung der TBE eine Rolle.

2.3.3.2. Virusübertragung

Für ihre Reifung brauchen Zecken während ihrer Entwicklung Temperaturen von ca. 15 °C. Die Bissaktivitäten der Zecken sind begrenzt auf Perioden von wöchentlichen Temperaturschwankungen von 7 bis 15°C und definierter Luftfeuchtigkeit. Daher treten Infektionen mit TBE-W Virus in den Monaten Mai bis Juni auf. Die TBE-S Virus Infektionen sieht man typischerweise im Frühjahr und im Herbst.
TBEV kann auch übertragen werden durch Genuss von nicht pasteurisierter Milch und Milchprodukten. Subklinisch infizierte Rinder, Schafe oder Ziegen scheiden Virus in der Milch aus und werden dadurch zur Infektionsquelle für den Menschen.
Weiterhin wurde von Laborinfektionen durch das Einatmen von Aerosolen berichtet.

2.3.3.3. Der Vektor

Stamm: Arthropoda (Gliederfüssler)
Klasse: Arachnida (Spinnentiere)
Ordnung: Acarina (Milben)
Familien: Ixodidae (Schildzecken), Argasidae (Lederzecken), Nuttaliellidae.

Zecken sind kosmopolitisch vorkommende temporäre Ektoparasiten, die zoologisch gesehen zum Stamm der Arthropoden (Gliedertiere) und darin zur Klasse der Spinnentiere (Arachnida) gehören. Sie besitzen im adulten Stadium acht Beine. Alle mobilen Entwicklungsstadien sind hämatophag, die lange Blutsaugezeit und die grosse Blutmenge begünstigen die Anreicherung von Krankheitserregern, die Übertragung erfolgt transstadial und transovariell (Kimming et al., 2000).
Man unterscheidet drei Familien: die Ixodidae (Schildzecken), Argasidae (Lederzecken) und Nuttalliellidae.

Ixodidae (Schildzecken)

Die Ixodidae stellen die größte der drei Familien dar. Sie wird in 19 Gattungen mit ca. 650 Arten aufgeteilt. Die Schildzecken tragen auf dem Rücken ein stark chitinisiertes Schild, das beim Männchen den Rücken ganz und beim Weibchen nur zur Hälfte bedeckt. Es gibt viele verschiedene Schildzeckenarten, die in der Wahl ihrer Habitate, Wirte und dem Blutsaugverhalten stark variieren. Die wichtigsten Spezies sind: Amblyomma, Boophilus, Hyalomma, Margaropus, Rhipicephalus, Ixodes, Dermacentor und Haemaphysalis. Die Ixodidae bevorzugen im Gegensatz zu den Argasidae eher feuchte Habitate. Sie leben frei auf dem Boden, bis sie einen Wirt gefunden haben. In jedem ihrer Entwicklungsstadien

saugen sie nur einmal. Ihre Wirte sind Säugetiere, Vögel oder Reptilien. Es gibt dreiwirtige Zecken, die nach jedem Entwicklungsstadium den Wirt wechseln, zweiwirtige (z.B. Rhipicephalus), bei denen Larve und Nymphe an demselben Wirt saugen, und einwirtige (z.B. Boophilus), deren Stadien auf demselben Wirt saugen. Der Saugvorgang dauert meist viele Tage. Während dieser Zeit saugen sie so viel Blut, daß ihre Körpergröße sich vervielfacht.

Überträger der TBE

Die CEE wird vorwiegend durch Ixodes ricinus und persulcatus übertragen, die RSSE meist durch Ixodes persulcatus, Dermacentor marginatus und silvarum und auch durch einige Haemaphysalis spezies.

Gattung Ixodes (Holzbock, Waldzecke)

Die Ixodesgattung gilt als die "typische" Zecke in Mitteleuropa. Es sind meist braune bis schwärzliche oder graue Tiere (siehe Abb. 3). Als Wirte der adulten Zecken werden Hunde, Katzen, Rinder und Menschen bevorzugt. In Europa ist I. ricinus Hauptüberträger der Borreliose (Borrelia burgdorferi) und der TBE, daneben kann auch Babesiose (Babesia bovi, B. divergens) übertragen werden. Es gibt Arten mit hoher Wirtsspezifität, die nur an bestimmten Wirten saugen. Daneben stehen Generalisten wie z.B. Ixodes ricinus, die jede Nahrungsquelle akzeptieren. Die Gattung Ixodes ist weltweit verbreitet. I. ricinus lebt vor allem in Gebüschen und an Waldrändern mit dichter Vegetation und an Orten mit relativ hoher Luftfeuchtigkeit.

Abbildung 3: I. scapularis, links: Weibchen, rechts: Männchen (Baxter 2005).

Gattung Dermacentor

Die Männchen dieser Art haben meist eine bläulich-bunt schillernde emailleartige Färbung (siehe Abb. 4). Als Wirte werden Säugetiere, darunter auch der Mensch, in wärmeren und trockeneren Gebiete bevorzugt. In Mitteleuropa ist D. marginalis, die Schafzecke, die häufigste Art der Gattung. Sie lebt jedoch nur in regional begrenzten warmen Gebieten, wie auf sonnigen Hängen oder Trockenrasen. Die Tiere der Gattung übertragen Tularämie (Francisella tularensis), Rocky-Mountains-Fleck-Fieber

(Rickettsia rickettsii), Q-Fieber (Rickettsia burneti), Rinderanaplasmose, Hundebabesiose (Babesia canis).

Abbildung 4: D. marginalis, links: Weibchen, rechts: Männchen (Baxter 2005)

Gattung Haemaphysalis

Als Wirte dienen vor allem kleine Säugetiere, jedoch auch der Mensch und Vögel. Die Tiere übertragen TBEV und verschiedene Piroplasmenarten (Theileria spec. und Babesia spec.).

Um abschätzen zu können, ob ein Infektionsrisiko nach einem Zeckenbiss besteht, macht es Sinn, die Zeckengattung zu bestimmen. Dies ist nicht unproblematisch, da Missbildungen der bei der Bestimmung wichtigen Merkmale wie z.B. dem Aufbau und der Größe des Hypostoms häufig vorkommen. Da die Schlüssel für die einzelnen Arten nach Larven, Nymphen, Männchen und Weibchen getrennt werden, wird in Tabelle 3 und 4 kurz beschrieben, wie man diese voneinander unterscheidet:

Larven	6 Beine, keine Geschlechtsöffnung, keine Stigmen.
Nymphen	8 Beine, keine Geschlechtsöffnung
Männchen	8 Beine. Bei den Schildzecken: Ganzer Rücken vom Scutum bedeckt. Bei Lederzecken: Hufeisenförmige Geschlechtöffnung.
Weibchen	8 Beine. Bei Schildzecken: Nur der vordere Teil des Rückens vom Scutum bedeckt. Bei Lederzecken: Geschlechtsöffnung oval.

Tabelle 3: Unterscheidungsmerkmale für Alters- und Geschlechtsdifferenzierung

1. Lederzecken (Argasidae) In Europa ist nur eine Gattung vertreten: *Argas*.
2. Schildzecken (Ixodidae)
   - 2.1. Die Analfurche umgibt den Anus von vorne: *Ixodes*
   - 2.2. Die Analfurche umgibt den Anus von hinten
     - 2.2.1. Adanalplatte vorhanden
       - 2.2.1.1 Gnathosoma und Pedipalpen kurz: *Rhipicephalus*
       - 2.2.1.2. Gnathosoma und Pedipalpen lang: *Hyalomma*
     - 2.2.2. Adanalplatte nicht vorhanden
       - 2.2.2.1. Augen seitlich des Scutums vorhanden: *Dermacentor*
       - 2.2.2.2. Keine Augen vorhanden: *Haemaphysalis*

Tabelle 4: Bestimmungsschlüssel für die mitteleuropäischen Zeckenarten (Mehlhorn und Mehlhorn 1996).

Wirtsfindung

Die meisten Schildzecken sind relativ wirtsunspezifisch. Sie saugen in jedem ihrer Entwicklungsstadien über eine Periode von mehreren Tagen bis Monaten nur an einem Wirt. Zur Wirtsfindung besitzen Zecken ein komplexes Sinnesorgan, das sogenannte Hallersche Organ. Es befindet sich an den Enden der Vorderbeine und kann mechanische, thermische und chemische Reize registrieren. Schildzecken klettern von der Erde bis zur Spitze eines Grashalms oder einer anderen Pflanze (positive Gravitaxis), wandern dann mehrfach entlang des Halmes auf und ab und kommen schließlich an der Spitze zur Ruhe. Sie können anhand der Erschütterung, der Körperwärme und des ausgeatmeten Kohlendioxids ihr Opfer erkennen. Schildzecken, die mehr oder weniger wirtsspezifisch sind, suchen sich Orte, die der Höhe ihres Wirtstieres am besten entsprechen. Bei Vibration, Geruchsreizen, oder bei einer plötzlichen Änderung der Belichtungsstärke wechseln sie sofort in eine Lauerstellung und haften sich dann an alles, was den Grashalm o.ä., auf dem sie sitzen, streift.

Der Saugvorgang bei Schildzecken

Hat eine Schildzecke einen Wirt gefunden und sich an ihm festgeheftet, krabbelt sie über dessen Körper und sucht eine Stelle, die ihr für das Saugen geeignet erscheint. Dort beginnt die Zecke durch seitliche Bewegungen der Chelizeren die Haut des Wirtes aufzuschneiden. Das Hypostom wird in die Wunde eingefügt. Die Pedipalpen spreizen sich dabei seitlich ab und schmiegen sich an die Haut des Wirtes. Dieser Vorgang des Eindringens in die Haut des Wirts dauert 10min bis 1h (oder länger). Derart in die Haut des Opfers gebohrt, sondern manche Zeckenarten zunächst eine zähe weiße Flüssigkeit ab, welche schließlich ihre Mundwerkzeuge völlig umschließt. Diese verhindert eine Entzündung der Wunde und verhärtet schließlich zu einer Art Zement. Auf diese Weise sind die Mundwerkzeuge der Zecke derart fest im Wirt verankert, daß eher das Gnathosoma abreißt, als dass sie sich loslösen lassen. Später wird diese Flüssigkeit auch direkt in die Wunde abgesondert, um die Festigkeit des Halts zu vergrößern und die Auswirkungen der Verletzung zu vermindern. Einmal auf diese Weise fest in der Haut verankert, schneidet sich die Zecke durch ruckartige Bewegungen ihrer Cheliceren noch tiefer in die Haut. Nun wird eine klare Flüssigkeit abgesondert, welche die Gerinnung des Blutes verhindert und die Gewebe des Wirtes lysiert. Die Wunde vergrößert sich dadurch rapide. Der Saugvorgang der Zecke besteht nun darin, dass sie abwechselnd Blut, Lymphflüssigkeit oder aufgelöste Gewebe in sich aufnimmt und Speichel absondert. Der erste Vorgang dauert zwei bis 30 Sekunden, der zweite ein bis zwei Sekunden. Dazwischen liegen inaktive Phasen von einigen Sekunden bis Minuten Länge. Durch diese wird eine Vermischung der beiden Flüssigkeiten verhindert. Das aufgenommene

Blut wird angedickt. Die Konzentration der Blutinhaltstoffe kann dabei auf das zwanzigfache ansteigen. Eine isotonische Salzlösung wird dem gesaugten Blut entzogen und zusammen mit dem Speichel wieder in die Wunde abgegeben. Bei den Schildzecken werden das Haemoglobin und die meisten Proteine fast sofort von den Zellen des Mitteldarms aufgenommen, welche dadurch ihre Größe vervielfachen. Neue Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass das Infektionsrisiko mit TBEV mit der Dauer der Blutmahlzeit der Zecke am Menschen steigt.

2.3.3.4. Pathogenese

Die Beschreibung der Pathogenese bezieht sich auf Angaben aus humanmedizinischer Literatur (Rolle und Mayr 2001). An der Einstichstelle der Zecke infiziert das TBE-Virus verschiedene Zellen, vor allem Gefässendothelzellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen. Durch die Lymphe erfolgt ein Transport in die regionären Lymphknoten, wo eine initiale Virusvermehrung stattfindet. Von dort aus gelangt das Virus durch das Blut in weitere Organe, insbesondere in die Leber, Milz und Knochenmark. Dort erfolgt eine weitere Virusvermehrung in den Zellen des reticulohistiozytären Systems.
In diesem Stadium zirkulieren die Viren in grossen Mengen im Blut, es besteht eine Virämie. Das Zentralnervensystem wird schliesslich nach der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke auf dem Blutweg erreicht, nachdem sich die Viren im Gefässendothel vermehrt haben. Es besteht weiterhin die Möglichkeit zur Infektion des ZNS über Verschleppung durch Makrophagen. Dort kommt es folglich zur Infektion und zum Absterben von Nervenzellen. Durch eine via Lymphozyten vermittelte Immunreaktion entsteht ein Gehirnödem, das zusätzlich schädigend auf umliegende Nervenzellen wirkt. Läsionen finden sich vor allem im Grosshirn, im Hirnstamm, im Kleinhirn, den Basalganglien und dem Rückenmark. Besonders empfindlich sind die motorischen Vorderhornzellen, welches häufig folgert in schlaffen irreversiblen Lähmungen der Arme, bzw. Vordergliedmaße. Der Erreger kann sich entlang von Nervenbahnen ausbreiten. Nach Einatmen von virushaltigen Aerosolen kann es zur Infektion der Nasenschleimhäute kommen und zur Weiterleitung des Erregers entlang der Riechbahnen in das Grosshirn.

2.3.3.5. Epidemiologie

Die TBE ist in mehreren europäischen Ländern eine wichtige Infektionskrankheit mit gesundheitspolitischen Auswirkungen. Beim Menschen werden in Europa mit hoher Dunkelziffer jährlich etwa 10.000 bis 12.000 klinische TBE Fälle beobachtet. Die TBE tritt in

endemischen Gebieten in einem grossen Teil Europas auf. In Russland, der Tschechischen Republik, Litauen, Estland und Lettland kann man die Audswirkungen der TBE als dramatisch bezeichnen, aber auch für Österreich (ungeimpfte Touristen), Deutschland, Polen und Ungarn besitzt die TBE eine nicht unerhebliche Bedeutung. Besonders zu beachten ist die TBE ausserdem in Kroatien, Schweden, Finnland und der Slowakischen Republik. Eine nur geringe Bedeutung hat die TBE in Italien, Griechenland, Norwegen und Dänemark. In diesen Ländern wurde Virus isoliert. Auf der Iberischen halbinsel, in den Beneluxstaaten, dem Vereinigten Königreich und Irland kommt das TBE-Virus autochton nicht vor.
Die jährliche Inzidenz liegt weltweit bei mehreren tausend Fällen pro Jahr. In Europa wird mit mehreren hundert Fällen pro Jahr die höchste Morbidität in Österreich, Slowenien, Ungarn, der Tschechischen und der Slowakischen Republik verzeichnet. In der ehemaligen Sowjetunion wurden allein 1990 5.500 Fälle registriert (Anonymus 2005).
Zwischen 1991 und 2001 erkrankten allein in Deutschland mehr als 1600 Patienten an TBE (Kaiser 2002). Die aktuellsten Zahlen liegen für das Jahr 2004 vor; danach wurde 274 TBE-Fälle beim Menschen in Deutschland registriert. Betroffen waren besonders Baden Württemberg (48%), Bayern (39%) und Hessen (9%). In den alten Bundesländern Deutschlands kommt das Virus vor allem in den südlichen Bundesländern Baden Württemberg und Bayern vor. Die Grenze nach Norden hin zieht der Verlauf des Mains. Nördlich liegt lediglich ein kleines Endemiegebiet im Raum Marburg-Biedenkopf. In Rheinland-Pfalz wurde ein Landkreis als Risikogebiet eingestuft und auch in Thüringen wurde die TBE kürzlich in drei Landkreisen nachgewiesen (Süss et al., 2004).

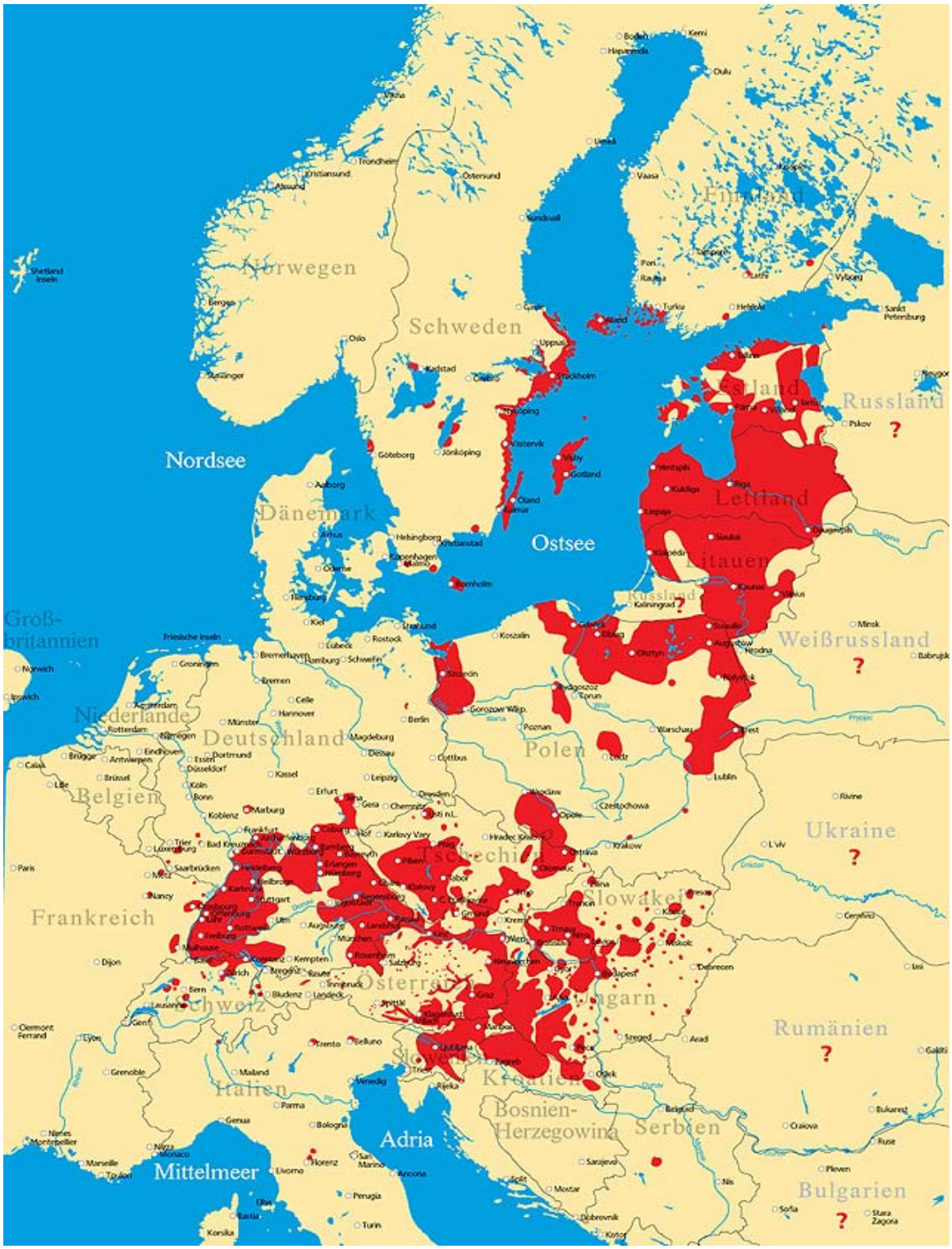

Abbildung 5: Verbreitung der TBE beim Menschen in Europa (Immuno 2004a)

Rote Markierungen: In diesen Gebieten sind in den letzten Jahren TBE-Fälle beim Menschen aufgetreten und dokumentiert worden.

Fragezeichen: In diesen Gebieten ist mit TBE beim Menschen zu rechnen. Eine genaue Dokumentation einzelner Erkrankungen liegt nicht vor.

2.4. Endemiegebiete

Im Hinblick auf das Vorkommen von TBE-Viren werden in Deutschland Endemiegebiete anhand von der beim Menschen gemeldeten Erkrankungsfälle in TBE-Risiko-, Hochrisiko- und Endemiegebiete mit sporadischen Erkrankungsfällen eingeteilt (RKI 2003).
Endemiegebiete lassen sich generell auf verschiedenen Wegen ermitteln. Eine gewisse Übersicht lässt sich durch die Registrierung und Lokalisierung klinischer Fälle beim Menschen erzielen. Voraussetzung ist allerdings, dass solche Fälle diagnostiziert und erfasst werden. Eine Meldepflicht allein ist meist ungenügend. Ein zweites epidemiologisches Verfahren ist die Ermittlung der Antikörperprävalenz beim Menschen und bei Tieren. Bei dieser Methode werden Individuen mit spezifisch gegen den Infektionserreger gerichteten Antikörpern erfasst und deren prozentuale Häufigkeit ermittelt. Damit lässt sich indirekt das Vorkommen der jeweiligen Krankheitserreger feststellen und lokalisieren. Aussagen über Erkrankungshäufigkeiten sind jedoch nicht möglich.
Das dritte Verfahren stellt die Untersuchung der Zecken mittels PCR dar. Die Ermittlung der Zeckeninfektionsraten ist das beste Verfahren, um direkte Aussagen zum menschlichen Infektionsrisiko zu treffen. Die Entwicklung der PCR hat grossflächige Zeckenuntersuchungen praktikabel werden lassen (Süss et al., 1996).
In Deutschland werden die Landkreise nach Definition des Robert-Koch-Instituts auf Basis von Daten zu TBE-Erkrankungsfällen in der Humanmedizin in drei Gefährdungsstufen eingeteilt. Es gibt Risikogebiete, Hochrisikogebiete und Endemiegebiete. Es gelten als

- TBE-Risikogebiete die Kreise, in denen mindestens 5 autochton entstandene TBE-Erkrankungen in einer 5-Jahresperiode zwischen 1985 und 2004 oder mindestens 2 autochton entstandene TBE-Erkrankungen innerhalb eines Jahres registriert werden.

- TBE-Hochrisikogebiete diejenigen der als Risikogebiete ausgewählten Kreise, in denen in einer 5-Jahresperiode zwischen 1985 und 2004 mindestens 25 TBE-Erkrankungen aufgetreten sind.

- Gebiete mit geringer TBE Endemizität: Die Risikodefinitionen (s.o.) sind nicht erfüllt, jedoch wurde in einer von 1997 bis 1999 durchgeführten Untersuchung eine erhöhte TBE-Antikörperprävalenz bei der Berufsgruppe der Waldarbeiter nachgewiesen (RKI 2005).

Abbildung 6: Verbreitung der TBE-Risiko-/ Hochrisiko- und Endemiegebiete beim Menschen in Deutschland (Immuno 2004b).

Orange Markierung: TBE-Risikogebiete

Rote Markierung: TBE-Hochrisikogebiete

Orange Streifen: Gebiete mit sporadischen Erkrankungsfällen

Rote Streifen: TBE-Gebiete ausserhalb Deutschlands

Rote Dreiecke: einzelne TBE-Erkrankungen, die in vergangenen Jahren in diesen Gebieten dokumentiert wurden

Blaue Rauten: In diesen Gebieten wurde TBEV mittels PCR in Zecken nachgewiesen

Um den Durchseuchungsgrad der Zecken mit TBE-Viren zu bestimmen und entsprechende Risikogebiete festzulegen, werden in Deutschland Zecken aus ausgewählten Gebieten auf diese Viren untersucht. Am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin geschieht dies im dort angesiedelten Referenzlaboratorium für durch Zecken übertragene Krankheiten.
In den letzten Jahren stellte man einen Rückgang der Durchseuchungsraten von Zecken fest. Umso überraschender ist das Ergebnis einer Studie des Referenzlaboratoriums im BfR (Süss et al., 2004). Danach wird der Durchseuchungsgrad von erwachsenen Zecken, die bereits am Menschen Blut gesogen haben, im Passauer Raum für das Jahr 2001 mit fast zehn Prozent beziffert. Die „Viruslast“ der adulten Zecken, die in diesem Gebiet aus dem Freiland gesammelt und untersucht wurden, und die noch keine Blutmahlzeit am Menschen genossen haben, lag dagegen bei dem erwarteten Wert von ca. einem Prozent. Ähnlich stellten sich die Ergebnisse bei den Nymphen dar. Während 0,4% der frei lebenden Nymphen im Passauer Raum, die noch nicht am Menschen gesogen haben, das Virus trugen, erreichen die Werte bei denen, die bereits eine Blutmahlzeit am Menschen hatten, sieben Prozent. Alle Durchseuchungsraten wurden molekularbiologisch ermittelt und durch Nukleinsäuresequenzdaten gesichert.
Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen sieht Süss in einer starken Virusvermehrung nach der Blutmahlzeit der Zecke. Denkbar ist, dass in der Vergangenheit Zecken als „virusfrei“ klassifiziert wurden, weil ihre „Viruslast“ so gering war, dass sie mit den angewandten Methoden nicht nachgewiesen werden konnten.
Seit dem Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) 2001 müssen alle TBE-Verdachtsfälle dem Robert-Koch-Institut (RKI) in Berlin gemeldet werden. Für das Jahr 2001 wurden dem RKI auf Basis des IfSG insgesamt 254 TBE-Fälle gemeldet. Darunter waren 108 Fälle aus Bayern, 117 Fälle aus Baden-Württemberg. Im Jahr 2002 wurden insgesamt 239 Erkrankungen gemeldet, darunter 78 aus Bayern, 114 aus Baden-Württemberg. In Thüringen (2001: 3 Fälle, 2002: 8 Fälle) und Hessen (2001: 10 Fälle, 2002: 8 Fälle) traten wesentlich weinger Fälle auf (Lukassowitz 2003).

2.5. Zielsetzung der Studie

Die vorliegende Studie verfolgte das Ziel, das Infektionsrisiko für Pferde mit dem Flavivirus TBEV in dem Endemiegebiet Marburg-Biedenkopf abzuschätzen. Hintergrund für diese Bemühungen war ein klinischer Fall aus der Pferdepraxis. Ein Pferd im Raum Marburg-Biedenkopf war im Herbst 2002 chronisch erkrankt. Die Besitzer dieses Pferdes beschrieben Unkonzentriertheit während der Dressurarbeit, mangelnden Appetit, Muskelabbau, Konditionsverlust und deutlich verschlechtertes Allgemeinbefinden. Schon zwei Jahre zuvor

war ein Pferd im selben Stall mit einer sehr ähnlichen Symptomatik schwer erkrankt, die diagnostischen Bemühungen des behandelnden Tierarztes blieben ohne kausalen Befund. Nachdem mehrfache klinische, hämatologische, toxikologische und serologische Untersuchungen ohne ursächlichen Befund geblieben waren, wurde Serum zur Diagnostik auf Antikörper gegen TBEV zu einem kommerziellen Labor (Fa. Laboklin) gesandt. Der Antikörperbefund war positiv. Eine weitere, wenige Tage später von dem selben Tier gewonnene Serumprobe wurde zu einem zweiten kommerziellen Laboratorium (Alomed, Dr. Müller, Radolfzell) zur Diagnostik auf Antikörper gegen TBEV eingesandt und wurde als negativ befunden.

Es stellten sich nun folgenden Fragen:

- War das Pferd mit TBEV infiziert?
- Verursachte dieser Erreger die klinische Symptomatik des erkrankten Pferdes?
- Lässt sich das TBEV-Infektions- und TBE-Erkrankungsrisiko für Pferde in dem Endemiegebiet Marburg-Biedenkopf abschätzen?
- Gibt es Möglichkeiten, Pferde vor der Infektion mit TBEV zu schützen?

Gemeinsam mit Prof. Thiel, Dr. König und Dr. Schmeel entstand die Idee, Blutproben im Endemiegebiet zu gewinnen und auf Antikörper gegen TBEV zu untersuchen. Weitere Bemühungen um genaue Informationen zu Testaufbau sowie Durchführung und Auswertung der in Deutschland kommerziell verfügbaren Tests für Pferde führten zum Entschluss, eigene speziell an das Pferd adaptierte Diagnostikverfahren zu etablieren.
Die Fragestellungen dieser Studie wurden folgendermaßen präzisiert:

1. Wieviele TBEV-Antikörper-positive Pferde gibt es im Raum Marburg-Biedenkopf?
2. Gibt es Pferde im Raum Marburg-Biedenkopf, die an TBE erkrankt sind?
3. Wie häufig treten im Zusammenhang mit dem Nachweis von anti-TBEV Antikörpern klinische Manifestationen beim Pferd auf?
4. Bestehen Beziehungen zu Haltungsform und Jahreszeit?

Mit Hilfe von Dr. Schmeel, Fa. Chiron-Behring Marburg wurde ein Konzept entwickelt, wonach ein SNT und ein ELISA, beide zur Verwendung in der Humanmedizin, an das Pferd adaptiert werden sollten. Desweiteren sollte eine Impfung durchgeführt werden. Der Impfstoff und die Materialien zur Etablierung des SNT und zum Teil auch des ELISA wurden von der Fa. Chiron-Behring kostenlos zur Verfügung gestellt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Biologische Materialien

Zellen:
A 549 Zellen (ATCC: CCL-185: humane Lungenkarzinom Zellen, erhalten von Fa. Chiron-Behring, Marburg)

Virus:
TBEV Stamm K 475 (erhalten von Fa. Chiron-Behring, Marburg); gelagert in Aliquots á 110 µl bei -80°C.

Seren:
Kontrollseren: (s. Anhang II)
Internes Standardserum gegen TBEV (siehe: 3.3.1.1.); aliquotiert á 120 µl und bei –20°C gelagert.
Negatives Kontrollserum: Serum von nicht infizierten Pferden aus Niedersachsen, Klosterhof Medingen, das sowohl im SNT als auch im ELISA als negativ befunden und gepoolt wurde, aliquotiert á 120µl und bei –20°C gelagert.

Testseren:
Seren von Tieren, die zur Bestimmung des Antikörpertiters gegen TBEV in dieser Studie gewonnen wurden. Testseren wurden bei 4°C gelagert. Wenn die Testseren nicht innerhalb von 48h getestet werden konnten, so erfolgte die Lagerung bei -20°C.

Nukleinsäuren:

Positive Kontroll-RNS: RNS gewonnen gemäß Protokoll aus Überstand bzw. Zellmaterial aus Humanen Lungenkarzinomzellen A 549 (Chiron-Behring, Marburg), die mit TBEV (K475, Chiron-Behring, Marburg) infiziert wurden.

3.1.2. Puffer und Medien

Zellkulturmedien:

1. Zellkulturmedium Eagles 1959: Eagles 1959 (erhalten von Fa. Chiron-Behring, Marburg), inklusive Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml).

2. Zellkulturmedium CCM-34: Dulbeccos´s MEM (Fa. Invitrogen) mit Zusätzen. Dulbecco`s MEM Pulvermedium für 10 Liter, 200 ml Aminosäuren-Stammlösung, 100 ml Vitaminlösung, 260 ml Hypoxanthin-Lösung, 300 ml $NaHCO_3$-Lösung, auf 10 Liter Aq. dd aufgefüllt, sterilfiltriert (0,1 µm) und bei 4°C gelagert, inklusive Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml).

Vitamin-Lösung: 0.010 g/l Biotin in 1 l Aq. dd gelöst

$NaHCO_3$-Lösung: 37 g $NaHCO_3$ in 300 ml Aq. dd aufgefüllt

Hypoxanthin-Lösung: 0.25 g Hypoxanthin, 4 ml 1 M HCL in 130 ml Aq. dd unter Erwärmung gelöst und auf 260 ml Aq. dd aufgefüllt.

Aminosäuren-Stammlösung: 0.712 g L-Alanin, 1.2 g L-Asparginsäure, 2.8 g Glycin, 3.0 g L-Glutaminsäure, 1.0 g L-Prolin in 800 ml Aq. dd gelöst bei 60°C und gelagert bei -70°C.

FBS: Foetales bovines Serum, getestet auf Freiheit von Mykoplasmen und Viren, gelagert bei -20°C. Das FBS wird vor der Verwendung bei 56°C für 30 Min. dekomplementiert und für max. 2 Wochen bei 4°C gelagert.

Trypsin/EDTA-Lösung: 8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na_2PO_4, 0,2 g/l KH_2PO_4, 2,5 g/l Trypsin, 1,23g/l Versen (EDTA), 0,016 g/l Phenolrot, mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt und gelagert bei 4°C für max. 4 Wochen.

Penicillin, Streptomycin 500x: 50 000 IU/ml Penicillin G, 50 mg/ml und bei -20°C aufbewahrt. Streptomycinsulfat in Aq. d1 gelöst, sterilfiltriert (0.1 µm), Fa. Fluka

Ethidiumbromid (10 mg/ml Ethidiumbromid Stammlösung)

Trypanblaulösung: 0.25% (w/v) Trypanblau (Serva 37252), 0.15 M NaCl in Aq. dd gelöst, filtriert (0.2 µm) und bei 4°C gelagert.

Aq dd: Wasser, doppelt destilliert

Puffer für RT: Puffer VIIIa: 2.5x Puffer für reverse Transkription: 125 mM TrisHCl (pH 8.3), 187.5 mM KCl, 7.5 mM $MgCl_2$, 25 mM Dithiothreitol (DTT), 1.25 mM dATP, 1.25 mM dCTP, 1.25 mM dTTP, 1.25 mM dGTP gelagert in 200 µl Aliquots bei –20°C.

Puffer für PCR: Puffer VIIIb: 5x Puffer für Polymerase Kettenreaktion: 25 mM TrisHCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 6.5 mM $MgCl_2$, 0.5% (v/v) Triton X 100, 0.1% (w/v) bovines Serumalbumin (BSA), 1.25 mM dATP, 1.25 mM dCTP, 1.25 mM dTTP, 1.25 mM dGTP gelagert in 200 µl Aliquots bei –20°C.

Agarosegellösung: 1.5% (w/v) Agarose (Fa, Gibco) in TAE Puffer (s.u.).

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 5 mM NaAcetat, 1 mM EDTA (pH 7.8).

Ladepuffer für Agarosegele: 0.1% (w/v) Orange G, 5.0 % (w/v) Ficoll 400 in 5x TAE Puffer (s.o).
TE-Puffer: 10 mM Tris-HCL (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0)

ELISA-Puffer:

ELISA-Waschpuffer: 0.3 M NaCl, 20 mM Tris, 2.5 mM KCl, gelöst in Aq. dd, auf pH 7.4 eingestellt, und 0.05% (v/v) Tween 20 (v/v) zugegeben.

Block-Puffer: 5% (w/v) BSA, 0.02% (w/v) NaN_3 in PBS gelöst, frisch angesetzt.

Citrat-Puffer: 0.1 M Citronensäure, 0.1 M Natriumcitratdihydrat auf pH 5 eingestellt.

ELISA-Stopp-Lösung: 3 M H_2SO_4 in Aq. dd verdünnt.

TMB-Substrat: 1-Step Turbo TMB-ELISA, Fa. Pierce

Probenpuffer FSME, (Tris-Pufferlösung 0,3mol/l) enthält mit Ultraschall behandeltes Antigen aus Treponema phagedenis und ist für die Verdünnung der Untersuchungsproben und der Referenzen zu benutzen. Konservierungsmittel: Amphotericin (ca. 5 mg/l) und Gentamycin (ca. 100mg/l).

Chromogen-Gebrauchslösung (100µl TMB+DMSO+9,9mM NaAcetat+3,3µl 30% (v/v) H_2SO_4)
Blocksubstanz (0,05% (v/v) Tween, 1% (w/v) Trockenmilch, PBS)

3.1.3. Enzyme

Reverse Transkriptase: Superscript II RNase H^- , Fa. Invitrogen.

DNS Polymerase: Biotherm Polymerase 5 U/µl, Fa. Gene Craft.

RNAse Inhibitor: Human Placenta RNase Inhibitor, 40 U/µl, Fa. TaKaRa.

3.1.4. Primer

Alle Primer wurden von der Firma Quiagen als Lyophilisate bezogen. Die Primer wurden mit 1x TE Puffer rekonstruiert (Endkonzentration 50 µM) und in Aliquots á 20 µl bei -20°C gelagert.

Primer für die reverse Transkription und die PCR-1:

TBE-1 (kodierend) 5´ GAGGCTGAACAACTGCACG 3`

TBE-2 (revers) 5´ GAACAGTCCATTCCTGATCT 3`

Primer für die PCR-2 (nested PCR):

TBE-3 (kodierend) 5´ ACGGAACGTGACAAGGCTAG 3`

TBE-4 (revers) 5´ GCTTGTTACCATCTTTGGAG 3`

3.1.5. Chemikalien

Agarose: Fa. GIBCO
TMB: Fa. Sigma
Tween 20: Fa. Serva
DMSO: Fa. Merck
Gentamicin: Fa. Serva
Schwefelsäure: Fa. Fluka
Ethanol: Fa. Fluka
DNS Größenmarker: 100 bp Ladder: Fa. Gibco

Weitere hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen GIBCO, Fluka, Serva, Sigma und Roth mit dem Reinheitsgrad p.A. bezogen.

3.1.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Autoklav (Sanoclav S ECZ): Fa. Wolf

Brutschränke (CO_2-Begasung): Fa. Forma Scientific und Inkubator C 200: Fa. Labotec

Elektrische Einkanaldispensierpipetten (10-250 µl, 50-1200 µl): Fa. Biohit
Elektrophoresekammern (horizontal): Werkstatt des Instituts für Virologie der Universität Giessen

ELISA-Reader: Fa. Tecan
Glaswaren: Fa. Schott

Kühlschränke: Fa. Liebherr

Magnetrührer: Fa. IKA

Elektrische Mehrkanaldispensierpipette (50-1200 µl): Fa. Biohit
Mehrkanalpipetten, Mikroliterpipetten (50-200 µl): Fa. Micronic
Mikroskop (CK X 31): Fa. Olympus

PCR-Kabinett: Fa. Heto-Holten

Photodokumentationssystem mit UV-Leuchtplatte (254nm): Fa. MWG

Pipettierhilfe: Fa. Integra
Sicherheitswerkbank (Klasse II), Lamin Air Sterilbank: Fa. Clean Air

Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400): Fa. Applied Biosystems

Vortex (MSI Minishaker): Fa. IKA

Waagen : Fa. Mettler

Wasserbäder (37°C, 56°C): Fa. Memmert
Zentrifuge (Megafuge 1.0 R): Fa. Heraeus Sepatech
Inkubationsschüttler: Fa. Heraeus
Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal: Fa. Fisher Scientific

Verbrauchsmaterialien

Anti-FSME Testkit (Enzygnost, Fa. Dade Behring): Mikrotitrationsplatte mit 12 Riegeln im Halterahmen. Jeder Riegel hat 8 Reaktionsvertiefungen, beschichtet mit FSMEV-Antigen aus inaktiviertem Virus. Proben-Puffer FSME
Aerosoldichte Filterspitzen: Fa. Nerbe

Einmalpipettenspitzen: Fa. Biozym

Reaktionsgefässe: Fa. Eppendorf

Einmalspritzen: Fa. Braun

Gewebekulturgefässe: Fa. Falcon

Mikrotiterplatten für Zellkultur, ELISA: Fa. Falcon, Fa. Nunc

Polypropylenröhrchen (5ml, 14ml, 50ml): Fa. Falcon

Tesafilm: Fa. Scotch

3.2. Methoden

3.2.1. Etablierung der Methoden

3.2.1.1. Gewinnung der positiven Kontrollseren

Zur Durchführung des SNT wurde ein positives Kontrollserum gegen TBE benötigt. Hierzu wurde eine Impfung durchgeführt, mit dem Ziel, Serum mit anti-TBEV-Antikörpern zu gewinnen.
Der Proband war ein 18 jähriger Hessenwallach namens „Rinaldo“. Der Wallach wurde vor und nach jeder Injektion klinisch untersucht. Es wurde der für die Anwendung am Menschen zugelassene TBE-Adsorbat-Impfstoff „Encepur“ der Chiron-Behring GmbH, Marburg für diesen Versuch ausgewählt; die Zusammensetzung des Impfstoffs liess keine Nebenwirkungen beim Pferd erwarten.
Der Impfstoff wurde dem Wallach zweimalig im Abstand von 4 Wochen intramuskulär injiziert. Die Impfstoffmenge von jeweils 3ml wurde festgesetzt, indem die Dosis von 0.5ml für einen erwachsenen Menschen auf das Körpergewicht des Pferdes hochgerechnet wurde.
Direkt vor der ersten Injektion und jeweils 14 Tage nach der ersten und zweiten Impfung und acht Wochen nach der zweiten Vakzination wurde Serum gewonnen und auf Antikörper gegen TBEV untersucht. Die geplante Boosterung nach sechs Monaten konnte nicht vorgenommen werden, da der Proband im November 2003 wegen fortgeschrittener Lahmheit aufgrund einer Podotrochlose euthanasiert wurde.
Das Serum mit dem höchsten Antikörpergehalt wurde zwei Wochen nach der zweiten Impfung gewonnen und für den SNT und den ELISA als Positivkontrolle verwendet.

3.2.1.2. Gewinnung der negativen Kontrollseren

Negatives Kontrollserum für den SNT
Das Serum des Pferdes „Rinaldo“, welches vor der ersten Vakzination genommen wurde, ist bei zwei kommerziellen tiermedizinischen Laboratorien mit negativem Ergebnis auf Antikörper gegen TBEV getestet worden und fand daher Verwendung als negatives Kontrollserum für den SNT.

Negatives Kontrollserum für den ELISA

Zur Erstellung eines Pools an anti TBE-Antikörper negativen Proben zur Evaluierung des ELISA wurden 24 Serumproben von Zuchstuten aus Norddeutschland (Klosterhof Medingen, Niedersachsen) gewonnen. Dieser Standort wurde ausgewählt, da er eine grosse Distanz zu Endemiegebieten für TBE in Deutschland hat. Alle Pferde waren klinisch gesund und hatten zeitlebens das Bundesland Niedersachsen nicht verlassen. Es konnte davon ausgegangen werden, dass diese Pferde keinen Kontakt mit dem TBEV hatten und somit auch keine Antikörper gegen das TBEV vorlagen. Diese Seren wurden im SNT auf Antikörper gegen das TBEV getestet und für serologisch negativ befunden.

3.2.1.3. Gewinnung der Testseren

Der Blutprobenentnahmezeitrahmen wurde festgelegt auf die Monate Juni, Juli und August. 240 Pferdeseren wurden in diesem Zeitraum gewonnen. Sechs der sieben Pferde mit positiven Antikörpertitern gegen TBEV im SNT wurden im Dezember 2003 wiederholt geblutet. Probenahmegebiet war der Landkreis Marburg-Biedenkopf. Alle 246 Proben wurden in der Folge getestet.

Die zu testende Pferdegruppe war so definiert, dass regelmässiger Weidegang gegeben sein musste und die Pferde innerhalb des Endemiegebietes mindestens 3 Monate gehalten worden sind. Eine gleichmässige Verteilung auf das Endemiegebiet wurde angestrebt.

Alle Pferde wurden klinisch untersucht unmittelbar bevor die Blutprobe entnommen wurde.

Es wurden unter sterilen Kautelen 10ml Vollblut aus der Vena jugularis entnommen. Die Blutproben wurden gekühlt transportiert. Nach erfolgter Blutgerinnung wurden sie in einer Zentrifuge der Fa. Hereus Sepatech bei einer g-Zahl von 2772 10 Minuten zentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand abgenommen, in 5ml Röhrchen überführt und bei -20°C konserviert.

3.2.1.4. Vermehrung der Kulturzellen

Die Zellen der Zellinie A 549 wurden in Brutschränken bei 5% CO_2, 37°C und feuchter Atmosphäre kultiviert. Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank der Sicherheitsstufe II durchgeführt.

Alle Zellen wurden passagiert, wenn sich konfluente Zellrasen in den Kulturgefässen gebildet hatten. Zunächst wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10-25 ml Trypsin-Lösung abgespült und anschliessend mit 1-2,5 ml Trypsinlösung ca. 3 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen durch vorsichtiges seitliches Schlagen auf die Zellkulturschale

von der Platte ablösten. Dann erfolgte die Aufnahme der Zellen in Medium und die Verteilung auf frische Zellkulturschalen in geeigneten Verdünnungen.

3.2.1.5. Infektion von Kulturzellen und Ernte von Kulturüberstand

Besondere Sicherheitsmassnahmen

Die Probenbearbeitung, sowie alle Versuchsschritte, die eine Verwendung oder den möglichen Kontakt zum Virusstamm bedingten, wurden in einem Labor der Sicherheitsklasse 3* unter einer Sterilbank mit Abzug (LaminAir, Fa. Heraeus) durchgeführt.

Alle Personen, die dieses Labor betreten durften, mussten gegen TBE geimpft sein. Der Antikörpertiter wurde kontrolliert.

Von zwei Zellkulturschalen (10cm Durchmesser) mit semikonfluenten Zellrasen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml Medium ohne FBS gewaschen, anschliessend wurden 1.1ml Virussuspension und 1ml Medium ohne FBS zugesetzt und 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dann wurde eine Schale mit Eagles-Medium mit 10% FBS und eine Schale mit CCM-34 mit 10% FBS aufgefüllt und weitere sechs Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Virushaltiger Kulturüberstand wurde abgenommen, zentrifugiert, gepoolt, aliquotiert und bei –70°C konserviert.

Titration zur Bestimmung des Virustiters

Es wurde eine Virusvorverdünnung von 1:500 hergestellt: 10µl Virus wurden mit 5ml Medium vermischt. Auf einer Mikrotiterplatte wurde je 100µl CCM 34-Medium und auf einer zweiten Mikrotiterplatte je 100µl Eagles-Medium/well vorgelegt.

Die Virusvorverdünnung wurde in die ersten vier Vertiefungen der ersten Spalte einer Microtiterplatte in Mengen von je 25µl /well gegeben und in 5er Schritten 12x herunterverdünnt, je zwei Reihen blieben frei als Zellkontrolle und wurden mit 25µl/well des jeweiligen Mediums belegt.

Anschliessend wurden 100µl Zellsuspension/well ($5x10^4$ Zellen/ml) aufgetragen.

Die Platten wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 vier Tage inkubiert. Die Titration wurde durch mikroskopische Beurteilung des konfluenten Zellrasens ausgewertet.

Die Berechnung des Virustiters erfolgte nach Spaerman-Kaerber.

Für den Einsatz im SNT wurde eine Virusgebrauchsverdünnung von 2000 $TCID_{50}$/ml angestrebt.

3.2.1.6. SNT

Allgemeines Prinzip des SNT

Die Neutralisation von Viren wird zum Nachweis und zur Quantifizierung virusneutralisierender Antikörper eingesetzt. Dabei wird zunächst eine Suspension eines Virusisolats mit dem fraglichen Serum vermischt, für eine bestimmte Zeitspanne inkubiert und danach auf ein Indikatorsystem, z.B. eine Zellkultur, übertragen. Nach der Inkubation im Indikatorsystem wird der Grad der Reduktion virusspezifischer Effekte im Vergleich mit einer entsprechenden negativen Kontrolle beurteilt. Werden im SNT Viren eingesetzt, die morphologische Veränderungen in der Zellkultur induzieren, so kann der Test durch Beurteilung des cytopathischen Effekts mikroskopisch ausgewertet werden.
Wird der SNT als quantitativer Test eingesetzt, müssen Verdünnungsreihen der zu testenden Seren hergestellt und mit dem bekannten Testvirusisolat in einer definierten Dosis inkubiert werden. Nach der Inkubation werden aus jeder Verdünnungsstufe mehrere Vertiefungen einer Zellkulturplatte beimpft. Danach werden Zellen zugesetzt. Die Serumtiter an nAk werden nach Ablesung der Platten mit Hilfe statistischer Verfahren errechnet.
Die Vorteile des SNT gegenüber anderen Verfahren zur Antikörperbestimmung sind vor allem in der hohen Spezifität und Sensitivität zu sehen. Der entscheidende Nachteil liegt im erheblichen Zeit-, Personal- und Materialaufwand. Ein weiterer Nachteil liegt in der schwierigen Standardisierbarkeit zwischen verschiedenen Untersuchungslaboren.

Durchführung des SNT

Vorbereitung der Testreagenzien
Eingefrorene Testseren und die Referenzseren wurden schnell bei 37°C aufgetaut und durchmischt. Vor der Verwendung wurden Test- und Referenzseren für 20 Min. bei 56°C im Wasserbad inaktivert.

Die Testviren wurden schnell unter fließendem Wasser aufgetaut und bis zur Verdünnung auf Eis gestellt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde die Testvirusgebrauchsverdünnung hergestellt (100 $TCID_{50}$/50µl in Zellkulturmedium).

Vorlage des Mediums
Platte 1 (siehe Abb. 14): In die Vertiefungen der Reihen 1 – 4 wurden 150µl Gewebekulturmedium vorgelegt; in alle anderen Vertiefungen wurden 100µl Gewebekulturmedium vorgelegt (Mehrkanaldispensierpipette).

Platten 2 – n: In alle Vertiefungen wurden 100µl Gewebekulturmedium vorgelegt (s.o.).

Verdünnung der Seren

Referenzseren

In die Vertiefungen B5 und B6 (siehe Abb. 14) wurden jeweils 50µl vorverdünntes anti-TBEV Antikörper positives Standardserum pipettiert. In die Vertiefungen B7 + B8 wurden jeweils 50µl negatives Standardserum pipettiert.

Der Inhalt der Vertiefungen B5 - B8 wurde mit einer 50µl-200µl Multikanalpipette durch mindestens 8x Aufziehen und Ausstoßen durchmischt. Je 50µl wurden in die folgenden Vertiefungen überführt und erneut durchmischt. Es wurde fortgefahren bis zu den Vertiefungen H5 - H8. Aus den letzten Vertiefungen wurden je 50µl verworfen.

Testseren

Platte 1: In die Vertiefungen A9 + A10 sowie B9 + B10 wurden jeweils 50µl Testserum #1, in die Vertiefungen A11 + A12 sowie B11 + B12 jeweils 50µl Testserum #2 pipettiert; Der Inhalt der Vertiefungen B9 – B12 wurde mit einer 50µl-200µl Multikanalpipette durch mindestens 8x Aufziehen und Ausstoßen durchmischt. Je 50µl wurden in die folgenden Vertiefungen überführt und erneut durchmischt. Es wurde fortgefahren bis zu den Vertiefungen H 9-H12. Aus den letzten Vertiefungen wurden je 50µl verworfen.

Platten 2 – n: In benachbarte Vertiefungen der Spalten A und B wurden jeweils 50µl der folgenden Testseren pipettiert (Duplikate).

Der Inhalt der Vertiefungen B1 – B12 wurde mit einer 50µl-200µl Multikanalpipette durch mindestens 8x Aufziehen und Ausstoßen durchmischt. Je 50µl wurden in die folgenden Vertiefungen überführt und erneut durchmischt. Es wurde fortgefahren bis zu den jeweils letzten Vertiefungen (H1 – H12). Aus den letzten Vertiefungen wurden je 50µl verworfen.

Zugabe der Testviren

In die Vertiefungen mit Kontroll- bzw. Testserumverdünnungsstufen ab Spalte B wurden mit einer automatischen Dispensierpipette je 50µl Virusgebrauchsverdünnung pipettiert (in Spalte A wurde kein Testvirus pipettiert zur Toxizitätskontrolle). Dabei wurde darauf geachtet, dass der Rand der Vertiefungen nicht mit den Pipettenspitzen berührt wurde.

Titration der Virusgebrauchsverdünnung

In die Vertiefungen A1 – A4 der Platte 1 wurden jeweils 50µl der betreffenden Virusgebrauchsverdünnung pipettiert. Mit einer Mehrkanalpipette (50µl-200µl) wurde der

Inhalt der Vertiefungen durchmischt (mindestens 8x) und je 50µl in die jeweils folgenden Vertiefungen pipettiert. Es wurde fortgefahren bis zu den Vertiefungen G1 – G4, dabei wurden jeweils neue Pipettenspitzen verwendet. Aus den letzten Vertiefungen wurden je 50µl verworfen.

Inkubation der Testplatten (ohne Indikatorzellen)

Vor Zugabe der Indikatorzellen wurden die Testplatten für 60 Minuten bei 37°C in einem Gewebekulturinkubator gelagert.

Zugabe der Indikatorzellen

Die Indikatorzellen wurden mikroskopisch beurteilt. Der Überstand wurde abgenommen und der Zellrasen mit 10ml Trypsin/EDTA Lösung gewaschen. Die Trypsin/EDTA Lösung wurde abgenommen und der feuchte Zellrasen für einige Minuten bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator gelagert. Die Zellen wurden durch seitliches Schlagen gegen die Zellkulturschale abgelöst und vorsichtig in 2ml Zellkulturmedium mit 15% FBS (v/v) vereinzelt (5ml Glaspipette). Der Zustand der Zellen wurde erneut mikroskopisch beurteilt. Nach Zugabe von weiteren 8ml Zellkulturmedium mit 15% FBS wurde die Zellsuspension in ein 50ml Röhrchen überführt. Die Zellzahl je ml wurde mittels Trypanblauexklusion (siehe Anhang: Protokoll Trypanblauexklusionstest) in einer Zählkammer ermittelt.

Die Zelldichte wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium mit 15% FBS auf $5x10^5$ Zellen/ml eingestellt. Mit einer automatischen Mehrkanaldispensierpipette wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten 50µl der Zellsuspension gegeben. Dabei durfte der Rand der Vertiefungen nicht mit den Pipettenspitzen berührt werden.

Inkubation der Testplatten (mit Indikatorzellen)

Die Testplatten wurden in einem Gewebekulturinkubator bei 37°C und 5% CO_2 für 3-4 Tage inkubiert.

Ablesen der Testplatten

Die Testplatten wurden mikroskopisch im Hellfeld beurteilt; dabei wurde die gesamte Oberfläche aller Vertiefungen betrachtet. Der Zellrasen wurde zunächst auf gleichmäßiges Zellwachstum überprüft. Zytotoxische Einflüsse der Testseren wurden durch einen Schrägstrich im Protokoll vermerkt. Vertiefungen, in denen eine mikrobielle Kontamination beobachtet wurde, waren nicht auswertbar und wurden mit einem X gekennzeichnet.

Das Vorliegen/nicht Vorliegen eines TBEV spezifischen zpE wurde im Testprotokoll eingetragen (+ zpE vorhanden, - kein zpE).

Berechnung der Ergebnisse und Validierung

Die Titer der Serumproben und der Virusgebrauchsverdünnung (VGV) wurden nach Spaerman-Kärber berechnet.

Die Titer der Serumproben wurden als $\log_{10}ND_{50}$ ($\log_{10}$ der höchsten Verdünnungsstufe eines Serums, bei der in 50% der Replikate kein zpE beobachtet wurde) angegeben.

Der Titer der VGV wurde als $\log_{10}TCID_{50}$ ($\log_{10}$ der höchsten Verdünnungsstufe, bei der in 50% der Replikate ein zpE beobachtet wurde) angegeben.

Der Test war auswertbar (valide) wenn:

- der Titer der VGV zwischen 30 und 300 $TCID_{50}$/50µl lag,
- der Titer des positiven Referenzserums statistisch nicht von den Mittelwerten der betreffenden Kontrollen aller vorangegangenen Tests – durchgeführt nach dem beschriebenen Schema- abweichte,
- der Titer des negativen Kontrollserums ≤ 0,24 $\log_{10}ND_{50}$ war und
- die Zellkontrollen (Platte 1 H1-H4) einen gleichmäßigen geschlossenen Zellrasen aufwiesen.

Ein Titer von > 0.24 $\log_{10}ND_{50}$ wurde als positiv beurteilt.

Wurden in den Toxizitätskontrollen von Testseren toxische Effekte beobachtet, so wurden diese Seren als nicht auswertbar bewertet. Eine Ausnahme wurde gemacht, wenn in höheren Serumverdünnungen eine eindeutige Hemmung der Virusvermehrung ohne Zytotoxizität beobachtet werden konnte.

3.2.1.7. ELISA

Allgemeines Prinzip des ELISA

Der ELISA stellt eine Methode zum Nachweis unterschiedlicher Substanzen dar, wie z.B. Hormone, verschiedene Proteine (Antikörper). Das Vorhandensein dieser Substanzen kann durch deren Reaktionen mit Detektionsantikörpern festgestellt werden. Die Detektionsantikörper sind mit einem Enzym markiert, das die Umsetzung eines Substrates ermöglicht. Dadurch wird eine stattgefundene Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen. Der ELISA wird in der Regel in Mikrotiterplatten aus Polystyren durchgeführt, da Polystyren grössere Moleküle wie Antikörper spontan binden kann. Die kommerziell erhältlichen ELISA-

Kits enthalten meist mit Antigenen oder Antikörpern vorbeschichtete Platten. Sollen Erreger-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, kann ein sogenannter indirekter ELISA Anwendung finden.
Nach erfolgter Bindung der nachzuweisenden primären Antikörper wird mit einem zweiten, anti-Spezies-spezifischen Antikörper inkubiert, der seinerseits mit einem Enzym markiert ist. Der Umsatz eines Enzymsubstrates zeigt die Anwesenheit der primär nachzuweisenden Antikörper in Bindung mit den anti Spezies-spezifischen Antikörpern an. Die Spezifität des Tests wird hier durch das eingesetzte Antigen bestimmt, das an die ELISA-Platte gebunden wird.
Vorteile des ELISA sind einfache, schnelle Handhabung. Indirekte ELISA neigen eher zu falsch positiven Resultaten, da der Testablauf stark von der Qualität (Spezifität) des Konjugats abhängt. Die Problematik besteht im Übergang von der Bindungsphase in die Lösungsphase. Bleibt das Konjugat gebunden, folgt ein falsch positives Ergebnis.

Die in der Untersuchungsprobe enthaltenen spezifischen Antikörper gegen das TBE-Virus binden an Antigen in den Vertiefungen der Testplatte. An diese spezifischen Antikörper bindet sich das Ziege-anti Pferd IgG/IgM-Konjugat. Durch das im Konjugat enthaltene Enzym wird die Chromogen-Gebrauchslösung unter Bildung einer blauen Farbe umgesetzt. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung beendet. Es erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Die Farbintensität des umgesetzten Substrats ist der in der Probe enthaltenen Konzentration an TBE-Virus-spezifischen Antikörpern proportional.

Durchführung des ELISA

Vorbereitung der Reagenzien
Alle Reagenzien und Untersuchungsproben wurden vor Testbeginn auf +18 bis +25°C erwärmt.

Testdurchführung
Je 100 µl der (1:20) mit Probenpuffer vorverdünnten anti-FSME-Virus-Referenz wurden in die beiden ersten Vertiefungen pipettiert.

Proben-Dosierung
Bei allen Pipettiervorgängen wurde für jede Position eine neue Pipettenspitze verwendet.
Die Pipettiervorgänge mussten zügig innerhalb von 15 Minuten pro Testplatte durchgeführt werden. Die fertige Testplatte wurde mit Folie abgeklebt und für 30 Minuten bei 37°C in einen Inkubator gestellt. Der Waschvorgang wurde unmittelbar angeschlossen.

Waschvorgang

Die Folie wurde abgezogen und der flüssige Inhalt aller Vertiefungen ausgegossen; dann wurden ca. 300µl verdünnte Waschlösung je Vertiefung eingefüllt, nach 1 bis 2 Minuten Einwirkzeit wurde abgesaugt. Der Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, nach Abschluss der Waschschritte wurde die nächste Reagenzdosierung sofort angeschlossen, um ein Eintrocknen zu verhindern.

Konjugat-Dosierung

Je Vertiefung wurden 100µl der Konjugat-Gebrauchslösung eingefüllt.

Konjugat-Inkubation

Die Module wurden mit neuer Folie abgeklebt und für 30 Minuten bei +37°C inkubiert. Der Waschvorgang wurde unmittelbar angeschlossen. Der Waschvorgang wurde durchgeführt wie bereits beschrieben.

Substrat-Dosierung

In jede Vertiefung wurden 100µl Chromogen-Gebrauchslösung pipettiert und mit neuer Folie abgeklebt.

Substrat-Inkubation

Es wurde 30 Minuten bei +18 bis +25°C lichtgeschützt inkubiert.

Stoppreaktion

Die Folie wurde entfernt, und je Vertiefung wurden100µl ELISA-Stopplösung zugegeben.

Photometrische Auswertung

Die Auswertung wurde innerhalb einer Stunde durchgeführt. Die Messwellenlänge war 450nm.

3.2.1.8. PCR

Allgemeines Prinzip der PCR

Die Polymerase Kettenreaktion stellt ein empfindliches Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren dar.

Dabei werden Genomabschnitte mit Hilfe definierter Oligonukleotide (Primer) und einer thermostabilen Polymerase in sich mehrfach wiederholenden Zyklen amplifiziert. Ein einzelner PCR-Zyklus besteht aus jeweils drei Reaktionsschritten. Alle Komponenten der Reaktion befinden sich von Anfang an in einem Reaktionsgefäss. Im ersten Reaktionsschritt, der „Denaturierung“, wird die doppelsträngige DNS auf 95°C erhitzt und somit zunächst in die beiden Einzelstränge aufgetrennt. Dann folgt der zweite Schritt, das „Annealing“. Durch Abkühlen der Temperatur meist auf 50 bis 60 °C können sich kleine DNS-Stücke, sogenannte „Primer“ über spezifische Basenpaarungen an die Einzelstränge anlagern. Nun folgt der dritte Schritt, die „Elongation“. In Gegenwart von DNS-Einzelbausteinen kann eine thermostabile DNS-abhängige DNS-Polymerase, die sog. „Taq-Polymerase“ die „Primer“ verlängern, sodass ein neuer DNS-Strang entsteht, der zu einem Teil des Ausgangsstranges komplementär ist. Diese Neusynthese wird bei einer Temperatur von 72°C durchgeführt, was dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase entspricht.

Im ersten Synthesezyklus entstehen aus einem Ausgangsdoppelstrang zwei Doppelstränge, die ihrerseits im nächsten Zyklus vervielfältigt werden können. Es handelt sich somit um eine exponentielle Vermehrung der Ausgangsstränge.

Auf diese Weise werden aus einem Gemisch verschiedener DNS-Moleküle gezielt DNS-Abschnitte vervielfältigt, die beispielsweise zu einem bestimmten zellulären Gen oder zum Genom eines Virus gehören. Die vervielfältigte DNS kann nach Auftrennung in der Gelelektrophorese durch Anfärbung sichtbar gemacht werden.

Voraussetzung für den Einsatz der PCR ist die Kenntnis von Bereichen der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen, denn diese sind Grundlage für die Auswahl der „Primer“. Da die Taq-Polymerase nur DNS amplifizieren kann, muß bei RNS-Viren das virale Genom zunächst in DNS umgeschrieben werden. Dieses Umschreiben wird als Reverse Transkription (RT) bezeichnet und geschieht unter Verwendung einer weiteren Polymerase, der Reversen Transkriptase.

Dieses Verfahren eignet sich zum empfindlichen Nachweis des Tick borne enzephalitis virus (TBEV) aus Probenmaterial (z.B. Liquor, Milch). Dabei wurde die Empfindlichkeit des Verfahrens durch die Durchführung einer zweiten PCR mit intern gelegenen Primern (nested-PCR) erhöht.

Das amplifizierte Genomsegment befindet sich im Bereich, der für das NS5-Protein des TBEV codiert. Alle Reaktionsschritte wurden in einem Thermocycler unter Verwendung gespeicherter Programme durchgeführt.

Der Nachweis amplifizierter RNS wurde mittels Gelelektrophorese durchgeführt und fotografisch dokumentiert.

Mögliche Fehler:
Hauptfehlerquelle ist eine Kontamination der Testreaktionen mit amplifizierter DNS (z.B. durch Verschleppung aus der Positivkontrolle), die zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Weiterhin musste eine Verschleppung von RNS und DNS zwischen den Probenansätzen verhindert werden. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die folgenden besonderen Vorsichtsmaßnahmen eingehalten:

- Bei der Durchführung aller Reaktionsschritte waren Handschuhe zu tragen; zwischen den einzelnen Schritten wurden die Handschuhe gewechselt.

- Alle Pipettierschritte der RT-PCR wurden unter einem laminaren Luftstrom (PCR-Kabinett) durchgeführt. Die Geräte wurden nach der Durchführung der Pipettierschritte durch UV-Licht dekontaminiert.

- Es wurde eine strikte räumliche Trennung zwischen den Bereichen für Probenaufarbeitung, Durchführung der RT-PCR (Amplifikation) und Nukleinsäureanalyse eingehalten.

- Pipettensätze wurden den entsprechenden Räumen zugeordnet und durften nicht entfernt werden.

- Alle Stammlösungen einschließlich der Mastermixe für die Reaktionsansätze wurden unter einer speziell dafür vorgesehenen Sicherheitswerkbank angesetzt und aliquotiert.

- Alle Reaktionsmixe wurden als Master-Mix angesetzt und dann auf die Reaktionsansätze verteilt.

- Es wurden ausschließlich Einmal-Pipettenspitzen mit aerosoldichten Filtern verwendet.

- Testansätze und Negativkontrollen wurden alternierend bearbeitet; je Testansatz wurde eine Negativkontrolle eingesetzt.

- Die Positivkontrolle wurde stets als letzter Ansatz bearbeitet.

Probenvorbereitung und RNS-Präparation

140µl Probenmaterial (Serum) wurde in ein 1.5 ml Röhrchen mit 560µl RNS Lysispuffer (Qiamp Kit, Puffer AVL) pipettiert und vollständig durchmischt.

Die Röhrchen wurden 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

560µl Ethanol (p.A.) wurde zugegeben und durch mehrfaches Aufziehen und Ausstoßen durchmischt.

630 µl des Ansatzes wurden auf Spin Column (Qiamp Kit) gegeben und bei 10.000U/min. für 1 Min. zentrifugiert (Mikrozentrifuge, Durchfluß wurde verworfen).

Die Säulen wurden in frische 2ml Röhrchen überführt, mit verbleibenden ca. 630µl des Ansatzes beschickt und erneut zentrifugiert (10.000U/min. für 1 Min).

Dann wurden die Säulen in frische 2ml Röhrchen überführt, mit 500µl Waschpuffer AW1 (Qiamp Kit) beschickt und erneut zentrifugiert (10.000U/min. für 1 Min).

Ein weiteres Mal wurden die Säulen in frische 2ml Röhrchen überführt, mit 500µl Waschpuffer AW2 (Qiamp Kit) beschickt und erneut zentrifugiert (13.000U/min. für 2 Min).

Zuletzt wurden die Säulen in 1.5ml Röhrchen (mit Deckel) überführt, 40µl Puffer AVE wurden direkt auf die Säulenmatrix pipettiert und der Ansatz wird für 1 Min bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei 8.000 U/Min wurden die Röhrchen für 1 Min zentrifugiert.

Die RNS wurde sofort auf 4°C gestellt bzw. zur Lagerung bei –20°C eingefroren.

RT-PCR

Das Ansetzen aller Mastermixe sowie das Verteilen des Start-Mastermix und des PCR-Mastermix in der PCR-2 auf die entsprechenden Reaktionsgefäße wurden in einem PCR-Kabinett durchgeführt.

Die Amplifikation der präparierten RNS wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Es wurden alternierend jeweils ein Testansatz (RNS präpariert aus Probenmaterial) und eine Kontaminationskontrolle (Aq dd_{PCR} anstelle von RNS) angesetzt. Weiterhin wurde am Ende jeder Testreihe eine Negativkontrolle sowie eine Positivkontrolle eingesetzt.

Reverse Transkription

Die benötigte Menge Start-Mastermix wurde angesetzt: (je Ansatz)

0.5µl Primer TBE-2

7.5µl Aq dd_{PCR}

Jeweils 9µl wurden auf 0.2ml PCR-Röhrchen verteilt; ohne Wechsel der Pipettenspitze.

2.5µl präparierte RNS bzw. Aq dd_{PCR} (Kontaminationskontrollen) wurden zugegeben, die Ansätze bei 94°C für 3 Min. denaturiert und danach auf 4°C abgekühlt

Die benötigte Menge RT-Mastermix wurde hergestellt: (je Ansatz)

8.0µl Puffer VIIIa

0.25µl RNase Inhibitor

0.25µl Reverse Transkriptase

Jeweils 8.5µl RT-Mastermix wurden in die PCR-Röhrchen gegeben; dabei musste beachtet werden, daß der RT-Mix direkt in die vorhandene Lösung pipettiert wird.

Die Ansätze wurden bei 45 °C für 30 Min. inkubiert und dann auf 4°C abgekühlt.

Polymerase Kettenreaktion (erste Runde)

Unmittelbar vor dem Ende der o.a. Inkubation wurde die benötigte Menge an PCR-Mastermix angesetzt; (je Ansatz)

10µl Puffer VIIIb

0.5 µl Primer TBE-1

19.3µl Aq dd_{PCR}

0.2µl Polymerase

Je 30µl PCR-Mix wurden pipettiert und die Röhrchen zur Amplifikation der cDNS in den Thermocycler zurückgestellt.

Die Ansätze wurden in den Thermocycler gestellt und über 30 Zyklen (94°C 30 Sek.; 55°C 20 Sek.; 72°C 30 Sek.) inkubiert, anschließend für 3 Min. bei 72°C inkubiert und schließlich auf 4°C abgekühlt)

Nach Abschluß der PCR-1 wurde i.d.R. unmittelbar die nested PCR durchgeführt. Die Reaktionsprodukte der PCR-1 wurden bei –20°C gelagert.

Nested PCR (PCR-2)

Unmittelbar vor dem Ende der PCR-1 wurde die benötigte Menge an nested-PCR-Mastermix angesetzt: (je Ansatz)

0.5µl Primer TBE-3

0.5µl Primer TBE-4

8.0µl Puffer VIIIa

10µl Puffer VIIIb

0.2µl Polymerase

28.3µl Aq dd_{PCR}

Jeweils 47.5µl nested-PCR-Mix wurden auf frische 0.2ml PCR-Röhrchen verteilt.

2.5µl aus den RT-PCR Ansätzen der ersten Runde wurden zugegeben.

Die Ansätze wurden in den Thermocycler gestellt und über 30 Zyklen (94°C 20 Sek.; 55°C 20 Sek.; 72°C 30 Sek.) inkubiert, anschließend für 3 Min. bei 72°C inkubiert und schließlich auf 4°C abgekühlt.

Die Reaktionsprodukte wurden sofort auf ein 1.5% Agarosegel aufgetragen (s.u.). Die Lagerung der Reaktionsprodukte erfolgte bei –20°C.

Analyse der Amplifikationsprodukte

In der Inkubationszeit der nested-PCR wurde ein horizontales 1.5% Agarosegel gegossen und nach dem Abkühlen mit TAE Puffer (incl. 1 µl/100ml Ethidiumbromid-Lösung) überschichtet. Für jeden Ansatz (PCR-1 und PCR-2) wurden 2µl Ladepuffer in eine Vertiefung einer 96well Rundbodenplatte pipettiert. Je Ansatz wurden 8µl Reaktionsprodukt in einer der Vertiefungen mit dem Ladepuffer vermischt und sofort in einen Schlitz des Agarosegels überführt. Es wurden alle Reaktionsprodukte (PCR-1 und PCR-2) aufgetragen. Zusätzlich wurde ein DNS Größenmarker aufgetragen (je 8µl auf den äußeren Spuren des Agarosegels). Die Reaktionsprodukte wurden für ca. 40 Min. bei 100V aufgetrennt (ca. 7V/cm) und danach unter UV-Licht (254nm) betrachtet (Augen vor dem UV-Licht schützen !). Das Ergebnis der Elektrophorese wurde photographisch dokumentiert.

Beurteilung und Interpretation der Ergebnisse

Das Testverfahren wurde nach den folgenden Kriterien validiert:

Bei keiner der negativen Kontrollen durften Banden in der erwarteten Größe von 0.427 kB bzw. 0.149 kB auftreten.

Bei der positiven Kontrolle mußte eine sichtbare Bande in der erwarteten Größe von 0.427 kB bzw. 0.149 kB sichtbar sein.

Waren die o.g. Kriterien erfüllt, so galt der Test als valide; war mindestens ein Kriterium nicht erfüllt, mußte der Test wiederholt werden.

Die Ergebnisse der zu testenden Proben wurden wie folgt beurteilt:

Positives Ergebnis:

in der PCR-1 traten Banden in der Größe von 0.427 kB und in der PCR-2 traten von 0.149 kB auf

oder

in der PCR-2 trat eine Bande in der Größe von 0.149 kB auf, während in der PCR-1 keine Bande in der Größe von 0.427 kB sichtbar war.

Negatives Ergebnis:

in der PCR-1 und in der PCR-2 traten keine Banden auf

oder

in der PCR-1 traten Banden auf, während in der PCR-2 keine Banden beobachtet werden konnten.

Die Ergebnisse lassen sich im Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik wie folgt interpretieren:

Positives Ergebnis: Es ist als sicher anzusehen, dass eine Infektion mit TBEV vorliegt. Das Vorliegen einer Infektion muss nicht bedeuten, dass eine Erkrankung vorliegt. Bei fehlender oder atypischer Symptomatik sollten weitere Proben untersucht werden.

Negatives Ergebnis: Ein negatives Ergebnis schließt das Vorliegen einer Infektion mit TBEV nicht aus.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der Methoden

4.1.1. Serumneutralisationstest (SNT)

Grundlage für die Entwicklung eines Tests zur Detektion von Antikörpern gegen TBEV bei Pferden war ein standardisierter SNT der Firma Dade-Behring, Marburg zum Nachweis von Antikörpern in humanen Seren.

Um Pferdeseren untersuchen zu können, mussten einige Modifikationen im Testaufbau vorgenommen werden. Zunächst wurden die im Test eingesetzten Indikatorzellen an das im Institut verwendete Kulturmedium (CCM-Medium) adaptiert. Versuchsreihen zeigten, dass unter Verwendung von Eagles-Medium bzw. CCM-Medium auf DMEM-Basis kein relevanter Unterschied der Parameter Zellwachstum und Ausprägung des TBEV spezifischen CPE beobachtet wurde. Als positives Kontrollserum wurde das Serum des geimpften Pferdes „Rinaldo“ mit dem höchsten Antikörpertiter (2 Wochen nach der 2. Vakzination) verwandt. Als negatives Kontrollserum diente das Präimmunserum von „Rinaldo“.

Ausgehend von dem Virusisolat TBEV K 475 wurde durch Anzucht auf A 549 Zellen (humane Lungenkarzinom-Zellen) ein Virusstock hergestellt; virushaltiger Kulturüberstand wurde geerntet, gepoolt, aliquotiert und bei – 70°C gelagert. Der gewonnene Virusstock wies einen Titer von $1x10^7$ $TCID_{50}$/ml auf. Die Berechnung des Virustiters erfolgte mittels der Formel nach Spaerman&Kaerber. Im Folgenden wurden verschiedene Virusdosen in Kombination mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen auf die Eignung zum Einsatz im SNT getestet.

Es zeigte sich, dass bei einer Virusgebrauchsverdünnung von 1:12.000 und einer Zellzahl von $1x10^5$/ml (50µl/Well) nach fünf Tagen ein deutlicher CPE (siehe Abbildung 7) vorlag. Die ermittelten Parameter bildeten die Grundlage für die folgenden Tests mit Pferdeseren.

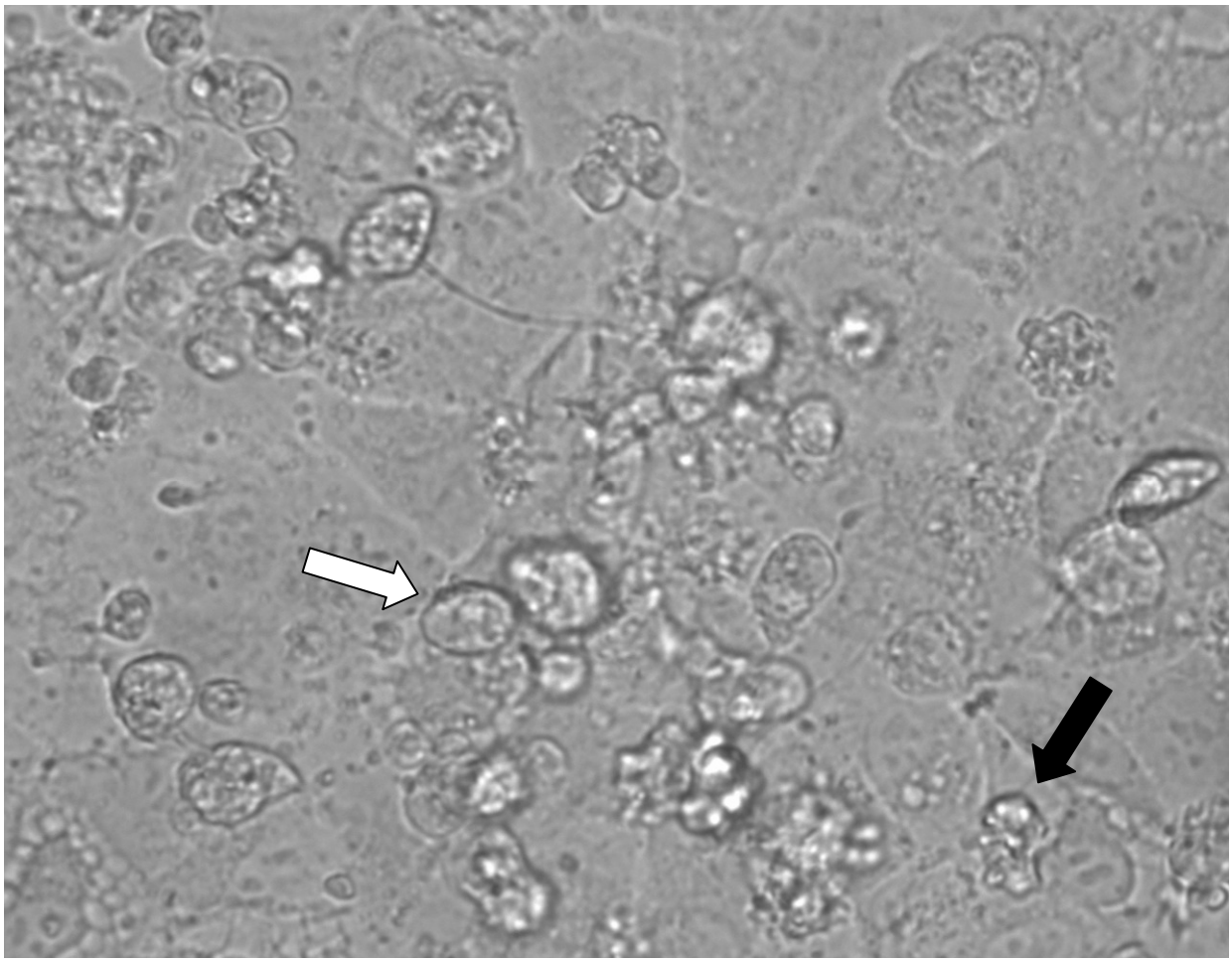

Abbildung 7: CPE im SNT

Diese Photographie veranschaulicht den cytopathischen Effekt des TBE-Virusstammes K475 auf A 549 Zellen nach fünf Tagen Inkubationszeit. Der CPE ist schwer zu erkennen. Er ist durch ein Abrunden der Zellen (weisser Pfeil) und das Auftreten von Zelldetritus (schwarzer Pfeil) gekennzeichnet.

4.1.2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Komponenten für den zu etablierenden ELISA wurden von der Firma DADE-Behring, Marburg käuflich erworben. Es handelt sich um einen indirekten ELISA. Da dieser ELISA zum Nachweis von humanen Antikörpern gegen TBEV dient, mussten verschiedene Reagenzien ersetzt werden. Statt eines anti-Human IgG Konjugates wurde ein Ziege anti-Pferd IgG/IgM Meerrettichperoxidase-Konjugat verwandt. Zur Bestimmung der optimalen Verdünnung des Konjugats wurden ELISA-Platten mit equinen Immunglobulinen beschichtet und dann eine Titration mit unterschiedlichen Konjugatkonzentrationen durchgeführt. Das Konjugat war optimal eingestellt bei einer Verdünnung von 1 zu 10.000. Entsprechend den Vorgaben des Herstellers für humane Seren wurden folgende Testparameter festgelegt:

Verdünnung der Testseren von 1:20 mit TBE-Probenpuffer und eine Inkubationszeit von 30 Minuten nach Zugabe der Chromogen-Farblösung bis zur Zugabe der Stopplösung. Als positives Kontrollserum diente wie schon zur Durchführung des SNT, das Serum des Pferdes “Rinaldo“ (ID 8 siehe 4.2.). Zur Ermittlung eines negativen Cut-off Wertes verwendeten wir die 24 serologisch negativen Pferdeseren aus Norddeutschland (Klosterhof Medingen, Niedersachsen). Dieser Standort in Norddeutschland wurde ausgewählt, da er eine grosse Distanz zu Endemiegebieten für TBE in Deutschland hat.
Nach Einsatz der Seren im ELISA wurde ein negativer Cut-off Wert wie folgt festgelegt: Der Mittelwert der optischen Dichte (OD) der negativen Seren addiert mit der zweifachen Standardabweichung ergab den Cut-off Wert 1, der Mittelwert der optischen Dichte (OD) der negativen Seren addiert mit der dreifachen Standardabweichung ergab den Cut-off Wert 2.
Alle Werte unterhalb des Cut-off Wertes 1 wurden als negativ angesehen, die Werte zwischen Cut-off Wert 1 und 2 als fraglich, alle Werte oberhalb des Cut-off Wertes 2 wurden als positiv beurteilt.
Cut off 1: MW (0,098)+2x Standardabw (0,027)= 0,152
Cut off 2: MW (0,098)+3x Standardabw (0,027)= 0,179
Daraus ergeben sich die Beurteilungsgrenzen in Prozent des positiven Kontrollserums:
< 28,2 als “negativ“
28,2 bis 33,2 als “fraglich“ und
> 33,2 als “positiv“.

Der Titer eines Testserums wurde, bezogen auf die Positivkontrolle, nach folgender Formel in Prozent angegeben:

$$\frac{OD\,Probe - OD\,Negatives\,Kontrollserum}{OD\,Positives\,Kontrollserum - OD\,Negatives\,Kontrollserum} x100\ (\%)$$

Es wurden 96 Pferdeseren in Doppelbestimmungen getestet. Die Auswahl der Proben erfolgte teils selektiv, teils zufällig. Alle Seren mit positivem Ergebnis (n=7) im SNT wurden im ELISA getestet, der Rest der Proben wurde per Zufall ausgewählt.

4.1.3. Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)

Die Auswahl der Primer erfolgte aus der Studie von Han (Han et al., 2001). Die Primer wurden verdünnt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Für die Herstellung einer positiven Kontrollprobe zur Durchführung der RT-PCR wurde eine Zellkulturschale mit A 549-Zellen mit TBEV infiziert. Der virushaltige Kulturüberstand wurde abgenommen, RNS gewonnen, aliquotiert und bei –20°C konserviert. Diese RNS wurde als Positivkontrolle verwendet.

Aus Überstand nicht infizierter A 549 Zellen wurde RNS gewonnen und als Negativkontrolle verwendet. Die RT-PCR wurde nach TBEV-Protokoll durchgeführt (siehe Kap. 3.3.1.6.). In der ersten Versuchsreihe wurden die Positiv- und Negativkontrolle qualitativ getestet. Anschliessend wurde ein Sensitivitätstest durchgeführt. Die präparierte RNS wurde in 10er Schritten über 5 Stufen verdünnt und getestet. Das PCR-Ergebnis ist in Abbildung 8 zu sehen. Es gelang die zuverlässige Detektion von 100 $TCID_{50}$/ml. Es wurde RNS aus im SNT und ELISA seropositiv getesteten Proben gewonnen und getestet.

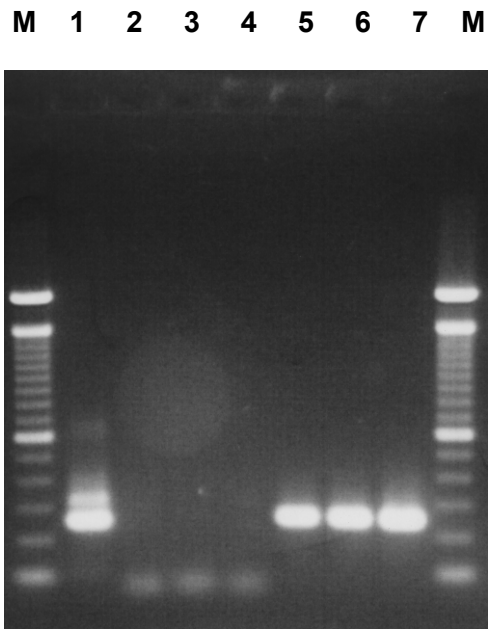

Abbildung 8: Sensitivität der RT-PCR

TBEV wurde präpariert und in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen und getestet. M bezeichnet den Marker, 1: Positivkontrolle unverdünnt, 2: Negativkontrolle, 3: Positivkontrolle $1:10^5$ verdünnt, 4: Positivkontrolle $1:10^4$ verdünnt, 5: Positivkontrolle $1:10^3$ verdünnt, 6: Positivkontrolle $1:10^2$ verdünnt, 7: Positivkontrolle $1:10^1$ verdünnt

4.1.4. Feldversuch

4.1.4.1. Auswahl der Proben

Probenentnahmegebiet war der Landkreis Marburg-Biedenkopf. Dieser Kreis wurde vom RKI in Berlin als FSME-Risikogebiet eingestuft.
Als FSME-Risikogebiet gelten die Kreise, in denen beim Menschen mindestens fünf autochton entstandene FSME-Erkrankungen innerhalb einer 5-Jahresperiode oder mindestens zwei autochton entstandene FSME-Erkrankungen innerhalb eines Jahres registriert wurden (RKI 2005).
Die zu testende Pferdegruppe war so definiert, dass regelmässiger Weidegang gegeben sein sollte und die Pferde mindestens drei Monate innerhalb des Endemiegebietes gehalten wurden. Bei der Gewinnung der Proben wurde versucht, eine gleichmässige Verteilung der Probeentnahmeorte über die gesamte Fläche des Endemiegebietes zu erreichen. In Abbildung 9 werden die Probenentnahmeorte und Probenzahlen anschaulich dargestellt. Es wurden Blutproben von 240 Pferden gewonnen. Alle Pferde wurden unmittelbar vor Blutprobenentnahme einer allgemeinen klinischen Untersuchung unterzogen. Bei allen Pferden mit einem seropositiven Befund im SNT (n=7) wurde eine ausführliche Anamnese erhoben. Der Zeitrahmen für die Blutprobenentnahme wurde festgelegt auf die Monate Juni, Juli und August, da in diesen Monaten mit einer erhöhten Exposition der Pferde gegenüber Zecken gerechnet wurde. Sechs der Pferde mit positiven Antikörpertitern gegen TBEV wurden im Dezember 2003 wiederholt geblutet. Ein Pferd konnte nicht nachuntersucht werden, da es kurz nach der ersten Probenentnahme euthanasiert wurde.
Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Seren (n=240) im SNT und 96 dieser Proben vergleichend mit dem ELISA auf Antikörper gegen das TBEV getestet. Die sieben im SNT positiven Seren wurden ausserdem mittels RT-PCR auf TBEV spezifische Nukleinsäuren untersucht.

Landkreis Marburg-Biedenkopf
10
9/ID5
8
6/ID3
2
8/ID7
4/ID4
13
3
10
4
8
9
1
3
5
3
10
4
4
3
1
5
5
7
1
2/ID1
7/ID6
2
4
11/ID2
3
13
5
3
2
3
15
3
9
6
3
Wollmar
Münchhausen
Oberasphe
Niederasphe
Melnau
Todenhausen
Bracht
Herbinghausen
Langendorf
Wohra
Halsdorf
Josbach
Albshausen
Mengsberg
Schwarzenborn
Ernshausen
Wollerode
Momberg
Hatzbach
Speckswinkel
Emsdorf
Erksdorf
Burgholz
Himmelsberg
Anzefahr
Stausebach
Langenstein
Stadtallendorf
Kirchhain
Amöneburg
Niederklein
Rüdigheim
Schönstadt
Rauschenberg
Sendernfeld
Betziesdorf
Bürgeln
Bernsdorf
Ginseldorf
Schönbach
Niederweid
Großseelheim
Kleinseelheim
Schröck
Bauerbach
Marburg
Cappel
Moischt
Wittelsberg
Beltershausen
Rauschholzhausen
Merzdorf
Erfurtshausen
Schönnsberg
Rüdigheim
Wehrda
Michelbach
Goßfelden
Sarnau
Göttingen
Colbe
Unterrosphe
Obereisphe
Niederweiter
Reddehausen
Schwarzenborn
Schwabendorf
Albshausen
Wats-kdutte
Halsdorf
Josbach
Ernshausen
Wollerode
Momberg
Hatzbach
Speckswinkel
Emsdorf
Erksdorf
Burgholz
Himmelsberg
Anzefahr
Stausebach
Langenstein
Stadtallendorf
Kirchhain
Amöneburg
Niederklein
Rüdigheim
Schönnsberg
Merzdorf
Erfurtshausen
Rauschholzhausen
Beltershausen
Wittelsberg
Moischt
Cappel
Marburg
Bauerbach
Schröck
Kleinseelheim
Großseelheim
Niederweid
Schönbach
Ginseldorf

4.2. Auswertung der Serumproben

4.2.1. Impfung - Gewinnung eines positiven Referenzserums

Zur Durchführung von serologischen Untersuchungsverfahren wurde ein positives Kontrollserum vom Pferd gegen TBEV benötigt. Hierzu wurde zunächst ein Impfversuch durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.1.1). Der Proband war ein 18 jähriger Hessenwallach.
Dieser zeigte nach den Vakzinationen keine Anzeichen von Nebenwirkungen. Wie erwartet, bildete der Wallach bereits vier Wochen nach der ersten Impfung einen recht hohen Antikörpertiter aus, der zwei Wochen nach der zweiten Impfung deutlich angestiegen war, um in der letzten Probe (acht Wochen nach der zweiten Vakzination) wieder abzufallen. Das Serum mit dem höchsten Antikörpergehalt wurde zwei Wochen nach der zweiten Impfung gewonnen und für den SNT und den ELISA als Positivkontrolle verwendet.
In der nachfolgenden Abbildung 10 wird der Verlauf des Antikörpertiters des Pferdes „Rinaldo“ (ID 8) veranschaulicht.

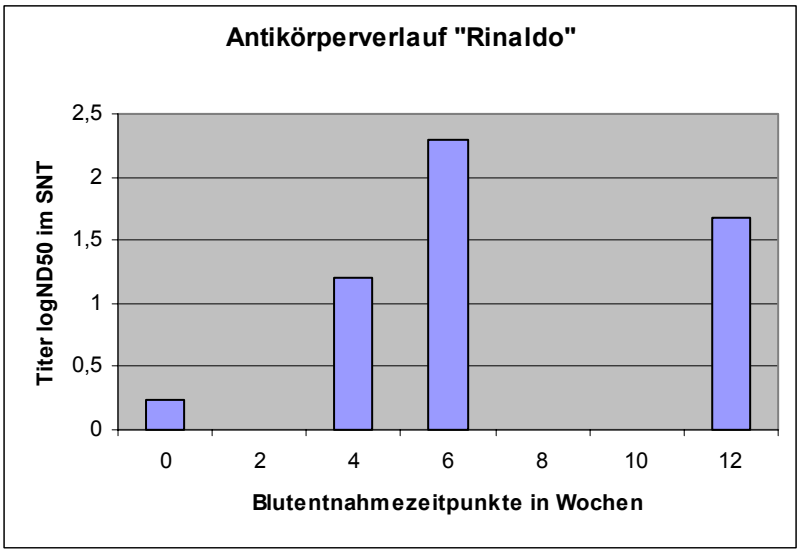

Abbildung 10: Verlauf des Antikörpertiters von „Rinaldo“ (ID8) im SNT
Die 1. Impfung fand statt zum Zeitpunkt 0, die 2. Impfung nach 4 Wochen appliziert.

Zum Zeitpunkt 0 wurde unmittelbar vor der 1. Impfung eine Serumprobe auf Antikörper gegen TBEV untersucht. Zeitpunkt 4 markiert die Serumprobe, welche 4 Wochen nach der ersten Vakzination und unmittelbar vor der zweiten Vakzination genommen wurde. Zeitpunkt 6 bezeichnet die Probe, die zwei Wochen nach der zweiten Vakzination gewonnen wurde. Am Zeitpunkt 12, acht Wochen nach der zweiten Vakzination, wurde die letzte Blutprobe

gewonnen. Die erste Impfung erfolgte direkt nach der Blutprobenentnahme zum Zeitpunkt 0, die zweite Impfung direkt nach der Blutprobenentnahme zum Zeitpunkt 4.

4.2.2. Untersuchungsergebnisse der Proben aus dem Feldversuch

4.2.2.1. Ergebnisse SNT

Alle 240 Proben wurden in einer Doppelbestimmung im SNT auf Antikörper gegen TBEV getestet. Sieben Proben waren seropositiv, sechs dieser seropositiven Proben konnten im Dezember 2003 wiederholt getestet werden. In Tabelle 5 werden die Untersuchungsergebnisse der seropositiven Tiere beider Untersuchungszeiträume dargestellt. Probe A bezeichnet die Proben, welche im Juni bis August 2003 gewonnen wurden, Probe B enthält die Proben des Probenentnahmeintervalles im Dezember 2003. 233 Proben waren seronegativ.

Sieben Pferde (3%) zeigten positive Befunde im SNT. Von diesen Pferden wurde bis auf ein Pferd (ID 7), das euthanasiert werden musste, im Dezember 2003 Serum gewonnen und erneut im SNT getestet, diese Proben werden „Probe B“ genannt. ID 8 bezeichnet die Serumprobe des geimpften Pferdes „Rinaldo“, die zwei Wochen nach der zweiten Vakzination gewonnen wurde und als positives Kontrollserum verwendet wurde, Probe B des Pferdes ID 8 (*) bezeichnet die Serumprobe, welche 8 Wochen nach der zweiten Vakzination gewonnen wurde.

ID	Probe A Titer (1:n)	Probe A Titer $log_{10}ND_{50}$	Probe B Titer (1:n)	Probe B Titer $log_{10}ND_{50}$
1	27	1,43	243	2,39
2	107	2,03	81	1,91
3	21	1,31	47	1,67
4	36	1,55	47	1,67
5	4	0,6	5	0,72
6	2	0,36	1,7	≤0,24
7	185	2,27	Keine	Keine
8	81	1,91	*16	*1,204

Tabelle 5: Antikörpertiter der seropositiven Probanden im SNT

Einander gegenübergestellt werden die doppelt getesteten und gemittelten Werte der seropositiven Probanden im SNT, jeweils aufgeführt in Titerstufen 1:n und $log_{10}ND_{50}$. Probe A bezeichnet das Probennahmeintervall im Juni-August 2003, Probe B das Probenentnahmeintervall im Dezember 2003. ID 8 bezeichnet die Serumprobe des geimpften Pferdes „Rinaldo“, die zwei Wochen nach der zweiten Vakzination gewonnen wurde und als positives Kontrollserum verwendet wurde, Probe B des Pferdes ID 8 (*) bezeichnet die Serumprobe, welche 8 Wochen nach der zweiten Vakzination gewonnen wurde.

Die Höhe des Antikörpertiters im SNT wird im Folgenden in vier Titerstufen aufgeteilt:

- Negativer Titer: <gleich 1:1,7
- Geringgradig positiver Titer: >1,7 bis 1:27
- Mittelgradig positiver Titer: >1:27 bis 1:140
- Hochgradig positiver Titer: >1:140

Vier Pferde mit geringgradig und mittelgradig positiven Titern (ID 3=1:21, ID 5=1:4, ID 6=1:2, ID 4=1:36) im SNT aus dem ersten Probenahmeintervall zeigten im zweiten Probenahmeintervall identische oder um weniger als eine Titerstufe ansteigende Antikörpertiter (siehe Abb. 11). Bei einem Pferd mit mittelgradig positivem Titer (ID 1=1:27) stieg der Antikörpertiter stark an (1:243); bei einem Pferd mit mittelgradig positiven Titer (ID 2=1:107) fiel der Titer um weniger als eine Titerstufe ab (1:81). Ein Pferd (ID 7) hatte einen

hochgradig positiven Titer (1:185) und wurde mit akuten zentralnervösen Symptomen euthanasiert; aus diesem Grund konnte keine B-Probe gewonnen werden.

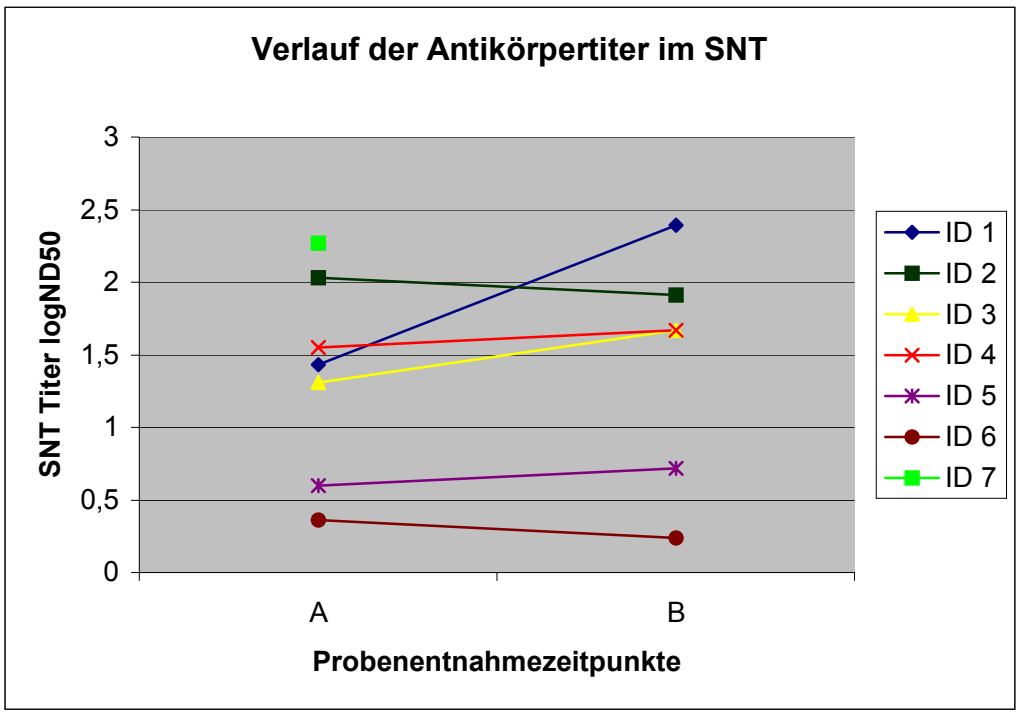

Abbildung 11: Verlauf der Antikörpertiter der seropositiven Probanden im SNT. Veranschaulicht wird der Titerverlauf in $\log_{10}ND_{50}$ zu den Probenentnahmezeitpunkten A (Juni/Juli/August 2003) und B (Dezember 2003).

4.2.2.2. Ergebnisse ELISA

Im ELISA wurden 96 Proben mittels Doppelbestimmung getestet. Aus Kostengründen konnten nicht alle 240 Seren im ELISA getestet werden, daher erfolgte eine Auswahl der Proben teils selektiv, teils zufällig. Alle Seren mit positivem und grenzwertigem Ergebnis im SNT wurden im ELISA getestet, der Rest der Auswahl erfolgte zufällig.
Die fünf Pferde (ID 1, ID 2, ID 3, ID 4, ID 7) mit den höchsten Titerstufen im SNT waren ebenfalls im ELISA positiv (siehe Abbildung 12 und Tabelle 6). Die Seren der beiden Pferde mit den niedrigsten Titern im SNT (ID 5, ID 6) waren im ELISA negativ.

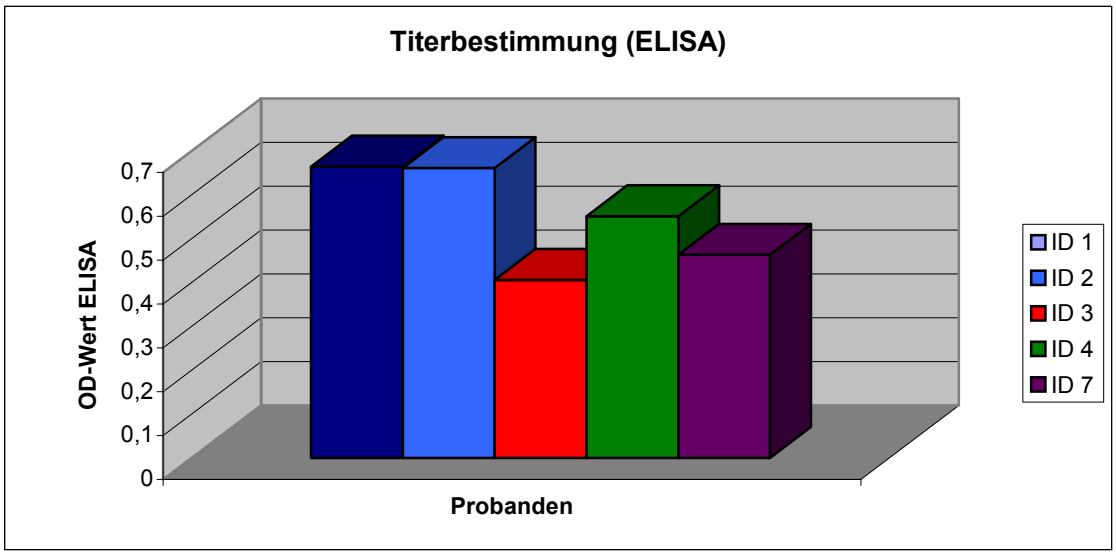

Abbildung 12: ELISA-Ergebnisse der 5 positiven Seren aus dem Feldversuch.
Diese Abbildung zeigt die $OD_{(450)}$-Werte der fünf im ELISA positiven Seren ID 1, ID 2, ID 3, ID 4 und ID 7.

4.2.2.3. SNT- und ELISA-Ergebnisse im Vergleich

ID	Titer im SNT in $log_{10}ND_{50}$	Titer im ELISA
1	1,43	118,15
2	2,03	117,54
3	1,31	66,13
4	1,55	95,36
7	2,27	77,62
8	1,91	100

Tabelle 6: Mittelwerte der Titer der positiven Proben im SNT und der Titerwerte im ELISA. ID 8 bezeichnet die Probe des geimpften Pferdes „Rinaldo“.

In der Vierfeldertafel werden 96 Proben dargestellt, die im SNT und im ELISA getestet wurden. 5 Proben waren in beiden Tests positiv, 2 Proben waren positiv im SNT und negativ im ELISA, 89 Proben waren negativ in beiden Tests.

		SNT	
		positiv	negativ
ELISA	positiv	5	0
	negativ	2	89

Tabelle 7: Vierfeldertafel: Qualitativer Vergleich der Ergebnisse von SNT und ELISA

Der Zusammenhang zwischen SNT und ELISA ist mittels Berechnung mit dem exakten Test nach Fischer statistisch gesichert ($p<0,0001$) und beträgt 97.9% (89+5 geteilt durch 96x 100%). Die Berechnung zum Vergleich der Testempfindlichkeit nach Mc Nemar ergibt einen p-Wert von 0,5 und ist somit nicht signifikant. Es ist keine Aussage zur unterschiedlichen Empfindlichkeit beider Tests möglich, da die Anzahl der positiven Testergebnisse zu gering ist.

In der nachfolgenden Abbildung wird die Kohaerenz zwischen SNT- und ELISA-Ergebnissen dargestellt. Bei den 5 in beiden Tests positiven Pferdeseren wurden die SNT-Ergebnisse den Ergebnissen im ELISA gegenübergestellt. Als 6. Probe (ID8) wurden die SNT- und ELISA-Ergebnisse des positiven Referenzserums des Probanden “Rinaldo“ integriert.

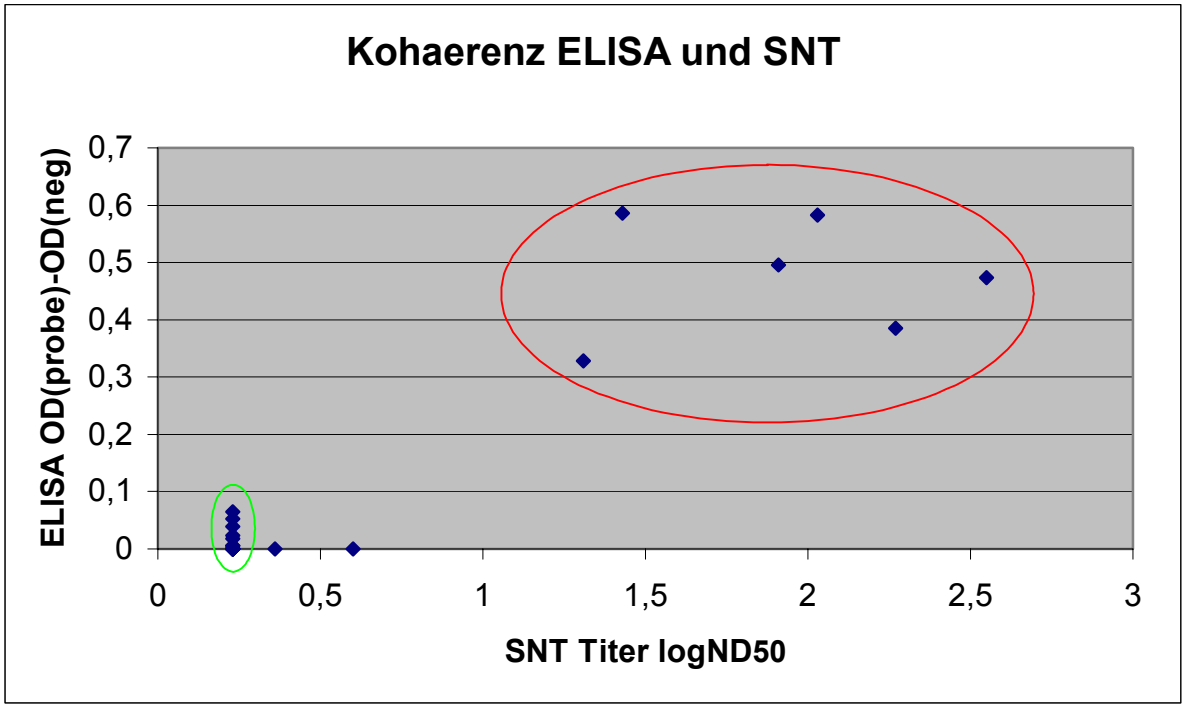

Abbildung 13: Quantitative Ergebnisse in ELISA und SNT.

Diese Abbildung zeigt die Kohaerenz der Ergebnisse von ELISA und SNT. Auf der y-Achse aufgetragen sind die Werte im ELISA (OD-Differenz: OD-Probe minus OD-Negative Kontrolle), auf der x-Achse die Werte im SNT ($log_{10}ND_{50}$). Die grüne Ellipse markiert die in beiden Tests negativ beurteilten Proben, die rote Ellipse umfasst die in ELISA und SNT als positiv ermittelten Seren.

Die Kohaerenz der beiden Tests wurde mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Der Rangkorrelationskoeffizient (r_S) beträgt 0,436, der p-Wert ist kleiner 0,0001; es besteht ein signifikanter Zusammenhang.

4.2.2.4. Ergebnisse RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR gelang die zuverlässige Detektion von viraler Nukleinsäure in einer Kontrollprobe (100 $TCID_{50}$/ml).
Es wurden alle sieben im SNT positiv getesteten Serumproben, inclusive der Verfolgsproben in der RT-PCR auf TBEV-spezifische Nukleinsäuren untersucht und als negativ befundet.

4.2.3. Verteilung der seropositiven Proben

4.2.3.1. Verteilung nach Rasse

Die untersuchten Proben stammen von Pferden verschiedener Rassen. Pferde seltener Rassen und Kreuzungen wurden unter Sonstige Rassen zusammengefügt (5 Pintos, 2 Tinker, 1 Friese, 3 Kreuzungen).
Nordamerikanische Rassen, wie Quarterhorses (8), Painthorses (4), wurden unter Amerikanischen Rassen zusammengefasst.
Spanische und portugiesische Rassen, wie Andalusier (4) und Lusitanos (2) wurden unter dem Oberbegriff Spanische Rassen zusammengefasst.
Unter Reitponyrassen wurden Deutsche Reitponys (6), Haflinger (9), Connemara Ponys (16), Isländer (2), New Forest Ponys (1) und Fjordpferde (1) zusammengefasst. Als Kleinponyrassen werden Shetland Ponies und Fallabella Ponies bezeichnet.
Alle Pferde, die im SNT positiv reagierten, waren Warmblüter.

Rasse	Anzahl	Seropositive Pferde	%
Warmblut	149	7	4,7
Arabisches Vollblut	7		0
Englisches Vollblut	4		0
Amerikanische Rassen	12		0
Spanische Rassen	6		0
Reitponyrassen	35		0
Kleinponyrassen	5		0
Sonstige Rassen	11		0
Unbekannt	11		

Tabelle 8: Rasseverteilung

4.2.3.2. Geschlechterverteilung

Ein Pferd mit seropositivem Ergebnis im SNT war weiblich, die restlichen Pferde waren Wallache.

Geschlecht	Anzahl	Seropositive Pferde	%
Stute	112	1	0,89
Hengst	12	0	0
Wallach	105	6	5,7
unbekannt	11	0	0

Tabelle 9: Geschlechterverteilung

4.2.3.3. Altersverteilung

Zur Vereinfachung der Darstellung wurden Altersgruppen von je drei Jahren zusammengefasst.
Das Alter aller im SNT seropositiven Reagenten lag zwischen 1 und 17 Jahren. Ein Pferd war ein Jahr alt, zwei Pferde waren 4 und eines 5 Jahre alt. Jeweils ein Pferd war 8, 10 und 15 Jahre alt.

Alter	Anzahl	Seropositive Pferde	%
0-3	23	1	4,4
4-6	41	3	7,3
7-9	63	1	1,6
10-13	37	1	2,7
14-17	35	1	2,9
18-21	14	0	0
22-25	8	0	0
26-29	3	0	0
>30	3	0	0
Unbekannt	13	0	0

Tabelle 10: Altersverteilung

4.2.3.4. Haltungsform

Es wurden nur Pferde getestet, bei denen eine Zeckenexposition wahrscheinlich ist. Daher musste regelmässiger Weidegang gewährleistet sein.
Vier der im SNT seropositiven Pferde wurden in Stall und regelmässiger Weidehaltung gehalten, drei Pferde waren zur Zeit der Probennahme auf der Sommerweide.

Haltungsform	Anzahl	Seropositive Pferde	%
Stall & Weide	177	4	2,26
Offenstall & Weide	13	0	0
Sommerweide	39	3	7,69
Unbekannt	11	0	0

Tabelle 11: Haltungsform

Die Daten Rasse, Geschlecht, Alter und Haltungsform der seropositiven Probanden wurden zur Prüfung auf Signifikanz mittels der exakten logistischen Regression mit dem Programm logXact unter Verwendung der sogenannten Permutationsstatistik berechnet (Metha und Patel 1993). Die Merkmale ergaben folgende p-Werte: Alter=0,6676, Geschlecht=0,5417, Rasse=0,8505, Haltungsform=0,8496. Wie aufgrund der geringen Probenzahl zu erwarten war, liessen sich keine Signifikanzen bestimmen.

4.2.4. Klinische Symptome der seropositiven Reagenten

Drei der seropositiven Pferde zeigten klinisch auffällige Befunde. Die restlichen vier Pferde waren vorberichtlich und zum Zeitpunkt der Probennahme klinisch unauffällig.

1. ID 1: 10 jähriger Warmblutwallach, Stall und Weidehaltung. Der Besitzer bemerkte drei Wochen nach Entnahme der ersten Serumprobe über etwa eine Woche vorübergehende geringgradige Taktfehler und vermehrtes Stolpern beim Kutsche fahren.
2. ID 4: 8 jähriger Warmblutwallach, Stall und Weidehaltung. Der Besitzer berichtet, dass das Pferd ca. 3 Monate vor Probennahme über die Dauer einer Woche Fieber hatte und eine Gaumensegellähmung diagnostiziert wurde. Es kam zur Heilung ad integrum.

3. ID 7: Der Jährling wurde festliegend auf der Sommerweide mit tonisch-klonischen Krämpfen gefunden. Er wurde euthanasiert wegen hochgradiger Symptomatik.

Seropositive Tiere im SNT

	ID 1	**ID 4**	**ID 7**
Probenentnahmezeitraum A	1,42	1,55	2,27
Probenentnahmezeitraum B	2,39	1,67	n.d.

Tabelle 12: Seropositive Probanden im SNT mit klinischen Symptomen. Die Titer im SNT werden angegeben in Titer $\log_{10}ND_{50}$. Die Probenentnahmezeiträume lagen im Juni-August (A) und Dezember (B) 2003.

5. Diskussion

Bei der Planung dieser Studie haben wir uns dafür entschieden, zwei ausgewählte Diagnostikverfahren zum Nachweis von anti-TBEV Antikörpern im eigenen Labor zu etablieren. Als Test mit einer hohen Spezifität und Sensitivität zur serologischen Diagnostik auf anti-TBEV Antikörper wurde der SNT ausgewählt. Testaufbau und -durchführung waren technisch recht einfach zu realisieren und die Ausgangsmaterialien kostengünstig. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu anderen Diagnostikverfahren, wie z.B. dem ELISA, ist, dass im SNT neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden, wodurch Hinweise auf eine protektive Immunität gewonnen werden können. Ein Nachteil des SNT liegt darin, dass die Versuchsdurchführung zeitaufwendig ist. Ausserdem waren die durch das Virus hervorgerufenen morphologischen Veränderungen der Testzellen schwierig zu beurteilen.

Um die Ergebnisse des SNT zu überprüfen, wurde ein indirekter ELISA angewandt. Ein Nachteil in der Verwendung des indirekten ELISA zur Diagnostik in einem kommerziellen Labor liegt darin, dass das Testsystem an jede einzelne Tierart adaptiert werden muss. Proben verschiedener Spezies können daher ohne weiteren Aufwand nur im SNT getestet werden. Negative und positive Kontrollseren lagen bei unseren Untersuchungen zunächst nicht vor. Zur Untersuchung grosser Probenzahlen auf Antikörper gegen TBEV in standardisierten Verfahren empfiehlt sich der ELISA als Diagnostikmethode der Wahl, da dieser Test, wenn er einmal etabliert ist, im Vergleich zum SNT wesentlich zeit- und kostengünstiger durchgeführt werden kann.

Eine Schwierigkeit bei der Evaluierung von SNT und ELISA bestand darin, dass ein externer Standard nicht verfügbar war. Daher wurde ein negativer Standard für SNT und ELISA aus Serumproben aufgebaut, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für Antikörper gegen TBEV negativ sind (siehe 3.2.1.2). Im SNT wurden diese Proben wie erwartet als negativ bewertet; sie dienten daher als ein Validierungskriterium für den ELISA. Da kein externer positiver Standard verfügbar war, wurde mittels einer Impfung ein interner Standard aufgebaut (siehe 3.2.1.1). Besonders wichtig war es, die Validität beider Diagnostikverfahren sicherzustellen. Da die Anzahl der ELISA-Testkits limitiert war und erwartet wurde, dass die im SNT negativ getesteten Seren auch im ELISA negativ sein werden, wurden nicht alle Seren im ELISA getestet. 96 Seren wurden zur Diagnostik im ELISA ausgewählt; in dieser Gruppe waren alle Seren enthalten, die im SNT positive oder zweifelhafte Ergebnisse aufwiesen. Für die Qualität der Testverfahren spricht die gute Wiederholbarkeit des SNT, eine Kohaerenz von 97,9% zwischen SNT und ELISA und ein signifikanter Zusammenhang (p-Wert< 0,0001) in der Korrelation zwischen der Höhe des Antikörpertiters im SNT und der Höhe des Antikörpertiters im ELISA. Die Differenz im SNT zwischen der ersten und zweiten Testung

der positiven Proben aus dem ersten Probennahmeintervall betrug im Mittel weniger als eine Titerstufe.

Die Entscheidung zur Etablierung einer RT-PCR mit dem Ziel des Nachweises von TBEV-Nukleinsäure wurde getroffen, da der Verdacht auf eine akute TBEV-Infektion mit hochgradiger klinischer Ausprägung bestand. Leider war lediglich eine Serumprobe dieses Probanden (ID 7) verfügbar.

Die PCR gilt als sehr sensitives Diagnostikum, welches eine Virämie mit hoher Wahrscheinlichkeit nachweist. Geeignetes Material zur Detektion TBEV-spezifischer Nukleinsäure aus Blutproben ist die Leukozytenfraktion. Als Probenmaterial wird mit EDTA koagulationsgehemmtes Blut verwendet. Serumproben stellen weniger geeignetes Probenmaterial dar, weil die Leukozytenfraktion nicht mehr enthalten ist. Daher haben wir die Wahrscheinlichkeit aus Serum ein positives Ergebnis zu erlangen, von vorneherein als gering eingestuft. Die Aussage von PCR-Ergebnissen als diagnostisches Verfahren zur Untersuchung von Blutproben auf TBEV ist eingeschränkt, da das TBEV einer raschen Clearance im peripheren Blut unterliegt (Süss et al., 1996). Untersuchungen aus der Humanmedizin zeigen, dass das Virus ca. 48 bis 96 Stunden nach Infektion die Blutbahn verlässt. Es ist daher vermutlich auch bei Tieren nur während einer sehr kurzen Zeitspanne möglich, virale Nukleinsäure im peripheren Blut nachzuweisen. Zur Diagnostik im Frühstadium (erste 96 Stunden post infectionem) einer perakuten bis akuten TBE-Erkrankung ist es daher sinnvoll, die PCR Methoden zum Nachweis von anti TBE-Antikörpern vorzuziehen, da die Möglichkeit in den ersten 96 Stunden nach Infektion Antikörper im Blut detektieren zu können als unwahrscheinlich einzustufen ist. Bei Verdacht einer TBEV-Infektion steht die Untersuchung von gepaarten Serumproben zur Antikörperdiagnostik an erster Stelle.

Zur Gewinnung eines positiven Referenzserums wurde eine Impfung durchgeführt. Zur Anwendung beim Menschen sind in Deutschland nur zwei Impfstoffe gegen TBE zugelassen: „Encepur“ der Firma Chiron-Behring und „FSME Immun“ der Firma Baxter. Beide Impfstoffe wurden in ihrer Zusammensetzung verglichen. Der Impfstoff „FSME Immun“ enthält im Gegensatz zu „Encepur“ seit 2001 Humanalbumin als Stabilisator. Da Fremdeiweiss generell eine mögliche allergene Potenz hat, schied der Impfstoff „FSME Immun“ für den Einsatz beim Pferd aus. Die Zusammensetzung des Impfstoffs “Encepur“ wurde mit der von gebräuchlichen equinen Influenza- und Herpesimpfstoffen verglichen. Komponenten, welche Unverträglichkeitsreaktionen beim Pferd erwarten lassen (Aluminiumhydroxid, Polygelin), waren in wesentlich geringeren Konzentrationen im Humanimpfstoff „Encepur“ enthalten als in anderen für Pferde zugelassenen und häufig verwendeten Impfstoffen. Seit 2002 wurde in der neuen Generation des Impfstoffs „Encepur“ der Stabilisator Polygelin durch Saccharose

ersetzt; letzterer wird keine allergene Potenz zugeschrieben. Der Impfstoff enthält inaktiviertes und durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigtes Virus in einer Dosierung von 1.5µg Antigen/Menschendosis. Das Virus wird für die Impfstoffherstellung beider Impfstoffe auf Hühnerfibroblasten-Zellkulturen vermehrt. In einer Impfstoffdosis „Encepur“ (0,5ml) sind ausserdem enthalten: 1 mg Aluminiumhydroxid als Adjuvans, < 0,005 mg Formaldehyd und Spuren der Antibiotika Neomycin, Gentamycin, Chlortetrazyklin. Der Impfstoff ist frei von Konservierungsmitteln. Im Vergleich mit „Encepur“ enthält der sehr häufig eingesetzte equine Herpes- und Influenza-Impfstoff „Resequin NN plus“ 15mg Aluminiumhydroxid/Dosis als Adjuvans, Immunostim 1 als Adjuvans (eingetragenes Warenzeichen der Vetrepharm Canada Inc.), Natriumtimerfonat als Konservierungsmittel, Spuren der Antibiotika Neomycin, Aureomycin, Formaldehyd, ausserdem Ovalbumin als Rückstand aus der Antigenherstellung (Petrausch 2003).

Somit enthält der Impfstoff „Encepur“ als Inhaltsstoff, der Nebenwirkungen beim Pferd hervorrufen könnte, lediglich Aluminiumhydroxid, diesen jedoch in wesentlich geringeren Dosen als in häufig verwendeten Impfstoffen für Pferde. Aufgrund des Vergleichs der Impfstoffzusammensetzung konnten wir die Injektion von „Encepur“ an den Probanden ohne wissenschaftliche Bedenken vertreten. Die Menge des applizierten Impfstoffes ist auf 3ml festgesetzt worden, indem die Dosis von 0,5ml für einen erwachsenen Menschen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 80 kg auf ca. 80% (480kg) des Körpergewichtes des Pferdes hochgerechnet wurde. Das geschätzte Gewicht des Warmblutwallachs „Rinaldo“ lag bei 600 kg. Nach Rücksprache mit Dr. Schmeel, Leiter der Abteilung zur Herstellung des Impfstoffs „Encepur“ der Fa. Dade-Behring, Marburg, sollte bereits eine geringere Dosis von beispielsweise 2ml für den Impfversuch ausreichen. Grund für die recht hoch gewählte Impfstoffdosis war die Überlegung, dass das zur Verfügung stehende 18 jährige Pferd ein weniger leistungsfähiges Immunsystem hat als ein junges Tier. Ausserdem war beabsichtigt, ein Serum mit einem möglichst hohen Antikörpertiter zu gewinnen. Es wäre interessant zu erproben, ob auf die Applikation einer geringeren Dosis von 1 oder 2 ml Impfstoff eine ebenso gute Immunantwort erfolgt. Die vorliegenden Daten zu der Vakzination eines singulären Pferdes sind nicht ausreichend, um generelle Aussagen u.a. zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern und zum längerfristigen Verlauf des Titers geben zu können. Insbesondere ist nicht bekannt, inwieweit die durchgeführte Impfung vor einer durch TBEV verursachten Erkrankung schützt. Das Pferd “Rinaldo“ zeigte nach den Impfungen keinerlei klinische Reaktionen. Die Applikationsstelle in der Pektoralismuskulatur war weder schmerzhaft, warm noch umfangsvermehrt. Eine klinische Untersuchung 30 Minuten und eine Stunde nach Applikation sowie an den drei nachfolgenden Tagen ergab keine auffälligen Befunde. Der ansteigende Titer von neutralisierenden Antikörper gegen das TBE-Virus bis zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der zweiten Vakzination dokumentiert die gute

Reaktion des Immunsystems auf den Impfstoff. Unbeantwortet bleibt die Frage, warum der Antikörpertiter, der zunächst kontinuierlich angestiegen ist, zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme acht Wochen nach der zweiten Vakzination wieder abgefallen war. Leider konnte der weitere Verlauf des Antikörpertiters nicht verfolgt werden, da das Pferd aufgrund einer sich progressiv verschlechternden Podotrochlose eingeschläfert werden musste. Die Reaktion des Immunsystems auf eine Impfung ist der natürlichen Exposition mit dem TBEV nicht gleichzusetzen.

Kreil et al. untersuchten den Mechanismus des durch die Impfung vermittelten Schutzes gegen die durch TBEV induzierte Erkrankung (Kreil et al., 1998). Verschiedene Studien zum Schutz vor der TBE Erkrankung in Mäusemodellen ergaben eine Korrelation zwischen Virusneutralisation in vitro und in vivo. In anderen Studien wurde ein Schutz in vivo erreicht, ohne dass im SNT eine Neutralisation gemessen werden konnte. Der Autor schliesst daraus, dass humorale und zelluläre Mechanismen zusammenwirken. Es konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen das Oberflächenglykoprotein E von TBEV eine protektive Immunität induzieren. Allerdings wird durch die Impfung eine Infektion nicht verhindert. Das Vorliegen einer Infektion wird detektiert durch den Nachweis von Antikörpern gegen das Nichtstrukturprotein NS 1 von TBEV und das Vorhandensein von zytotoxischen T-Zellen. Nichtstrukturproteine waren in diesen inaktivierten Vakzinen nicht enthalten, daher beweist das Vorkommen von Antikörpern gegen NS 1 eine Replikation von Viren im Organismus. Der Nachweis einer Virämie mittels PCR gelang nicht. Nach Kreil kommt es folglich durch die Impfung zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern und zum Schutz vor der Erkrankung, nicht jedoch zum Schutz vor einer Infektion. In einem Mäuseinfektionsversuch konnte gezeigt werden, dass durch Übertragung von TBEV-spezifischen cytotoxischen T-Zellen allein keine Immunität bei naiven Tieren erzeugt werden konnte. Ein adoptiver Transfer von Immunserum hingegen führte zur Ausbildung einer protektiven Immunität.

Der Impfversuch des Pferdes „Rinaldo“ mit dem Impfstoff „Encepur“ der Firma Chiron-Behring ist erfolgreich verlaufen. Das gewonnene Serum enthielt einen ausreichenden Gehalt an neutralisierenden Antikörpern, um als Positivkontrolle für die diagnostischen Verfahren verwendet zu werden. Aufgrund der Entwicklung des Titers an neutralisierenden Antikörpern kann vermutet werden, dass bei „Rinaldo“ nach der zweiten Injektion ein wirksamer Impfschutz vor einer TBE-Erkrankung bestand. Diese These kann nur durch gezielte Infektionsversuche an einer grösseren Anzahl geimpfter Pferde mit vergleichbaren Antikörpertitern bestätigt werden.

Vor der Beantwortung der dieser Untersuchung zugrundeliegenden Fragestellungen stellt sich die Frage nach der Aussagekraft dieser Studie. Die Aussagekraft der etablierten Untersuchungsverfahren kann nach eigenen Untersuchungen als ausreichend eingeschätzt werden. Welche Aussage kann getroffen werden, wenn eine einzelne Probe eines Pferdes

im SNT oder ELISA einen anti-TBEV Antikörpertiter aufweist? Bei einem erwachsenen Tier mit einem einmaligen seropositiven Ergebnis hat hochwahrscheinlich eine Reaktion des Immunsystems auf die Infektion mit TBEV stattgefunden. Es kann jedoch nicht auf das Vorliegen einer klinischen Erkrankung geschlossen werden (Kreil et al., 1998). ELISA- und SNT-Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen TBEV können auch unspezifische Reaktionen zeigen und daher zu falsch-positiven Testergebnissen führen (Allwinn et al., 2002). Diese unspezifischen Reaktionen können z.B. durch Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren (u.a. Dengue- oder Gelbfiebervirus) ausgelöst werden. Holzmann beschreibt beim Menschen nach der Impfung gegen TBE eine signifikante Korrelation zwischen ELISA IgG-Titern und Antikörpertitern, die im Hämagglutinations-Hemmungstest und im Serumneutralisationstest nachweisbar waren (Holzmann et al., 1996). Eine Exposition mit anderen Flavivirusantigenen wie einer Gelbfieberimpfung und/oder Dengue Virus Infektion induzierte ebenfalls signifikante Antikörperspiegel im TBEV-ELISA und TBEV-HHT-Test, führte jedoch nicht zur Bildung von messbaren neutralisierenden Antikörpern gegen TBEV.

Wenn eine Aussage zum Immunstatus eines Probanden gegeben werden soll, kann ein positives Ergebnis im ELISA durch weiterführende serologische Untersuchungen überprüft werden, die neutralisierende Antikörpertiter nachweisen. Allerdings sind das Vorhandensein von Antikörpern gegen andere Flaviviren und bestehende Titer durch eine vorausgegangene TBE-Impfung beim Pferd in Deutschland als unwahrscheinlich einzustufen. Denkbar ist eine Kreuzreaktion nach einer Impfung gegen das West Nile Virus, wie sie zumindest bei Pferden auf dem nordamerikanischen Kontinent häufig durchgeführt wird. Wenn eine seropositive Probe vorliegt, sollte innerhalb von vier Wochen eine zweite Serumprobe gewonnen und untersucht werden. Auch eine solche gepaarte Serumprobe lässt nur eine nach Richtlinien aus der Humanmedizin geschätzte Aussage zum Verlauf der Infektion zu, da kaum Daten zum anti-TBEV Antikörperverlauf beim Pferd vorliegen. Wie bereits Luckschander (Luckschander 1998) und Janitza (Janitza et al., 2002) in ihren Studien belegen, ist der Anteil von tatsächlich klinisch erkrankten im Vergleich mit serologisch positiven Tieren sowohl bei Hunden als auch bei Pferden gering. Daher sollte bei Vorliegen eines seropositiven Befundes in Verbindung mit zentralnervöser Symptomatik eine gründliche Untersuchung des Patienten erfolgen, um alle differentialdiagnostisch relevanten Erkrankungen auszuschliessen.

Eine weitere Frage ist zu klären: Ist die untersuchte Pferdegruppe repräsentativ für das TBE-Endemiegebiet und kann somit eine Aussage über die epidemiologische Situation der TBEV-Infektion der Pferdepopulation im Endemiegebiet Marburg-Biedenkopf gemacht werden? Nach der Studie von Özdemir, der Erkrankungsfälle beim Menschen im Endemiegebiet Marburg-Biedenkopf untersucht hat, traten alle humanen TBE-Fälle nordöstlich von Marburg

auf (Özdemir et al., 1999). Zwei Menschen erkrankten nahe Langendorf bei Wohra und drei weitere TBE-Fälle wurden bei Speckswinkel nahe Stadtallendorf registriert. Die Definition eines Endemiegebiets richtet sich nach bestimmten Kriterien. Mit nur zwei Infektionen innerhalb des Jahres 1997 waren die Kriterien für die Benennung des Landkreises Marburg-Biedenkopf zum TBE-Endemiegebiet erfüllt. Die Grösse des Endemiegebiets richtet sich nach den Grenzen des Landkreises. Daher kommt es häufig vor, dass innerhalb eines grossen als Endemiegebiet deklarierten Landkreises nur ein tatsächlicher „Hot Spot“ existiert. In der vorliegenden Studie befanden sich die seropositiven Pferde in Neustadt, Ernsthausen, Rauschenberg, Elmshausen, Wehrshausen (2) und Wetter. Die Fälle ID 1, 2 und 6 liegen nordöstlich von Marburg, ID 3, 4 und 7 befinden sich direkt westlich von Marburg, ID 5 unweit nördlich von Marburg. Alle seropositiven Pferde befanden sich daher in der mittleren nördlichen und nordöstlichen Hälfte des Endemiegebiets. Im nordöstlichen Teil des Endemiegebiets sind auch die klinischen TBE-Fälle beim Menschen aufgetreten. Im mittleren Drittel und im nordöstlichen Teil von Marburg-Biedenkopf fand die überwiegende Probennahme bei Pferden statt. Im westlichen Drittel und im südöstlichen Achtel des Gebiets wurden wenige Pferdeblutproben gewonnen. Nach den Fallzahlen aus der Humanmedizin ist in diesen Gebieten am wenigsten mit dem Vorkommen infizierter Pferde zu rechnen. Eine gleichmässige Verteilung der Probennahme über das Endemiegebiet wurde zwar zunächst angestrebt, aber zugunsten einer schwerpunktmässigen Probenentnahme in Regionen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen von TBE aufgegeben. Interessant ist die Tatsache, dass alle seropositiven Pferde aus unterschiedlichen Beständen stammen. Bei gleicher Exponierung mit infizierten Zecken, wie sie bei Pferdegruppenhaltung gewährleistet sein sollte, war eher zu erwarten, dass mehrere Pferde im selben Bestand Antikörper gegen TBEV aufweisen.

Es stellt sich die Frage, wie häufig im Zusammenhang mit dem Nachweis von anti-TBEV Antikörpern klinische Manifestationen beim Pferd auftreten. Diese Frage zu beantworten fällt aus verschiedenen Gründen schwer. Zum Einen mangelt es an Daten zur Seroprävalenz beim Pferd, zum Anderen ist es aus bereits genannten Gründen schwierig, eine TBE nachzuweisen. Beim Menschen verlaufen in Europa ca. 60% aller Infektionen mit TBE-W inapparent (Kaiser 2002). Verschiedene Studien zur natürlichen TBEV-Infektion bei Hunden in Süddeutschland und Österreich geben Seroprävalenzen mit durchschnittlich 23% an mit vermuteten Erkrankungsraten von weniger als 10% der seropositiven Tiere (Müller 1997). Janitza berichtete in ihrer Studie von einer Seroprävalenz beim Pferd in Süddeutschland von 23,4% (Janitza et al., 2002), Luckschander kam in ihrer Studie zur TBE beim Pferd in Österreich auf 13% seropositive Pferde. Acht der sechzig seropositiven Pferde (6%) zeigten klinische Symptome wie Ataxien, Fieber, Zusammenbrechen und Koliksymptome, die im Zusammenhang mit einer TBEV-Infektion stehen könnten (Luckschander 1998). Die von

Waldvogel beschriebenen schweren neurologischen Symptome konnten bei zwei Pferden festgestellt werden, bei einem sprachen der klinische Verlauf, der positive TBEV-Antikörpertiter und die Ergebnisse der neuropathologischen Untersuchung für eine TBEV-Infektion (Waldvogel et al., 1981). Den eindeutigen Nachweis einer durch TBEV verursachten Erkrankung konnten weder Janitza et al. noch Luckschander et al. führen.
In der vorliegenden Studie waren sieben Pferde (3%) seropositiv. Vier Pferde hatten im Abstand von ca. fünf Monaten einen persistierenden geringgradig positiven Antikörpertiter. Diese Tiere hatten wahrscheinlich eine länger zurückliegende TBEV-Infektion durchlaufen. Der moderate Titeranstieg von 1:20 auf 1:47 bei einem dieser Tiere und der Titerabfall von 1:107 auf 1:81 bei einem anderen Tier können auf Schwankungen im SNT zurückzuführen sein und sind daher zu vernachlässigen.
Die Pferde ID 5 und ID 6 mit den niedrigsten Antikörpertitern im SNT könnten falsch positiv beurteilt worden sein, eine lang zurückliegende Infektion durchgemacht haben, eine schwache Immunantwort auf das TBEV entwickelt haben oder mit einer geringen Virusdosis konfrontiert worden sein. Bei dem Pferd ID 6 war im zweiten Probennahmeintervall kein Antikörpertiter mehr nachweisbar.
Der Proband ID 4 hatte einen mittelgradig positiven Titer. ID 4 ist ein 8 jähriger Warmblutwallach, der nachts im Stall und tagsüber auf der Weide gehalten wurde. Vorberichtlich zeigte er im Frühjahr des Jahres 2003 über die Dauer einer Woche Fieber und eine partielle Gaumensegellähmung. Der Haustierarzt hatte das Pferd mit nichtsteroidalen Antiphlogistika und Antibiotika über eine Woche behandelt. Es kam innerhalb von ca. 14 Tagen zu einer Heilung ad integrum. Die vom Haustierarzt festgestellte ätiologisch ungeklärte Gaumensegellähmung könnte auf eine TBEV-Infektion zurückzuführen sein. Dieses Symptom wird regelmässig im Zusammenhang mit einer TBEV-Infektion von Menschen beschrieben (Kaiser 2002).

Im Fall des Probanden ID 1, der einen starken Titeranstieg von 1:27 in der Probe A auf 1:243 in der Probe B zeigt, könnte eine erstmalige TBE-Infektion mit subklinischem Verlauf oder eine wiederholte Infektion vorgelegen haben. ID1 bezeichnet einen 10 jährigen Warmblutwallach, der im Stall und auf der Weide gehalten wurde. Der Besitzer bemerkte drei Wochen nach Entnahme der ersten Serumprobe über ca. eine Woche vorübergehende geringgradige Taktfehler und vermehrtes Stolpern beim Kutschefahren. Da die Symptomatik nur kurz andauerte, liess der Besitzer das Tier nicht tierärztlich untersuchen. Sowohl zum Zeitpunkt der ersten Probennahme als auch bei der zweiten war das Pferd bei der allgemeinen Untersuchung ohne klinischen Befund.

Das Pferd ID 7 zeigte eine akute zentralnervöse Symptomatik mit einem hochgradig positiven Titer im SNT (1:185) und gab somit Anlass zur Vermutung, dass es sich um eine durch TBEV verursachte Symptomatik handelte. Der Junghengst befand sich ganztägig auf

der Sommerweide. Er wurde festliegend auf der Weide gefunden und zeigte dauerhafte tonisch-klonische Krämpfe bei erhaltenem Bewusstsein. Das Tier wurde in eine Pferdeklinik transportiert und dort wegen hochgradiger Symptomatik euthanasiert. Es wurde keine Sektion vorgenommen, so dass Gewebeproben leider nicht zur Verfügung standen. Da wegen der raschen Euthanasie des Probanden nur eine Serumprobe zur Verfügung stand und somit weitere Diagnostik nicht möglich war, wurde versucht, aus dem Serum TBEV-spezifische Nukleinsäure via RT-PCR zu detektieren. Wünschenswert wären eine Blutuntersuchung und die Untersuchung einer Liquorprobe auf anti-TBEV Antikörper und virale Nukleinsäure gewesen, sowie die patho-histologische Untersuchung des ZNS.

Beziehungen zwischen den Probanden mit positiven Ergebnissen im SNT zu Haltung und Jahreszeit konnten in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Die Merkmale Ort, Rasse, Alter, Geschlecht und Haltung wurden untersucht. Aufgrund der geringen Anzahl an seropositiven Pferden konnten in dieser Studie keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden. In der Untersuchung von Janitza, in der 205 Pferde im Raum Bodensee auf Antikörper gegen TBEV untersucht wurden, waren Ort, Haltung, Weidegang und Altersgruppe Risikofaktoren (Janitza et al., 2002). Die Merkmale Rasse und Geschlecht hatten keinen signifikanten Einfluss. Der Aufenthalt in einem bestimmten Teil des Untersuchungsgebietes, reine Koppelhaltung und häufiger Weidegang erhöhten die Wahrscheinlichkeit für Seropositivität eines Individuums mit zunehmendem Alter. Diese Daten stimmen weitgehend mit der Studie von Luckschander überein, die in einer österreichischen Pferdepopulation 469 Pferdeseren auf Antikörper gegen TBEV untersucht hat (Luckschander 1998). In ihrer Studie war die Wahrscheinlichkeit einer Seropositivität von einem Aufenthalt in den TBE-Endemiegebieten innerhalb Österreichs (47%) und häufigem Weidegang (66%) abhängig. Eine Rassen- oder Geschlechtsdisposition lag nicht vor. Der Anteil an seropositiven Reagenten stieg mit dem Alter an. Eine Häufung der Seroreagenten war in den Sommer- und Frühjahrsmonaten festzustellen.

Schlussfolgerungen für Praxis und Forschung

Wichtig für eine gute Interpretation in der Diagnostik der TBEV-Infektion beim Pferd sind Angaben zum Verlauf und der Halbwertszeit von anti-TBEV Antikörpertitern. Wie die Untersuchungsergebnisse der positiven Proben dieser Studie im zweiten Probennahmeintervall zeigen, waren anti-TBEV Antikörper recht lange nachweisbar. Die vier mit TBEV auf natürliche Weise infizierten Pferde ID 1, ID 2, ID 3 und ID 4 zeigten innerhalb der fünf bis sechs Monate zwischen beiden Probennahmeintervallen gleichbleibende Antikörpertiter. Diese Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass eine Infektion mit TBEV bei Pferden länger als sechs Monate nachweisbar ist. Hofmann et al. präsentierten eine Studie,

die unter anderem die Persistenz der Antikörpertiter untersucht (Hofmann et al., 1983). Sie verglichen die Persistenz von anti-TBEV IgM-Antikörpertitern beim Menschen nach einer natürlichen Infektion und nach Impfung mittels ELISA. Nach einer natürlichen Infektion konnten Antikörper sechs bis acht Monate nach Erkrankung nachgewiesen werden. Im Vakzinationsversuch konnten IgM-Antikörper in keinem Fall länger als 10 Monate nach der zweiten oder dritten Impfung nachgewiesen werden.

Antikörperbestimmungen beim Pferd eignen sich sehr gut zum Monitoring der Endemiegebiete um u.a. das aktuelle Infektionsrisiko mit TBEV für den Menschen abzuschätzen. Die Daten zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen TBEV beim Pferd in den Studien von Luckschander in Österreich und Janitza in Süddeutschland für die jeweilige Region sind mit den Daten der Seroprävalenz von Antikörpern gegen TBEV beim Menschen vergleichbar. Diese Vergleichbarkeit der Seroprävalenz bei Mensch und Pferd scheint sich auch in dieser Studie wiederzufinden, der Beweis wurde jedoch nicht geführt.
Das regelmässige Monitoring der TBE-Endemiegebiete ist sehr wichtig. Wie Süss berichtete, entwickelt sich die epidemiologische Situation der Naturherdgebiete sehr unterschiedlich (Süss et al., 1997). Es fehlen effektive Überwachungssysteme, die eine Beurteilung der aktuellen Lage zum Infektionsrisiko für den Menschen erlauben. Er beobachtete in seinen Studien, dass die Aktivität der Naturherde einem ständigem Wandel unterworfen ist: Sie scheinen entweder neu zu entstehen, werden nach endemischer Latenzzeit reaktiviert, erlöschen nach hoher Aktivität und anschliessender endemischer Latenz völlig (Gebiete in Mecklenburg-Vorpommern) oder breiten sich vom Zentrum aus (Gebiete in Bayern) (Süss et al., 1996).

Matile berichtet, dass der Hund ein besserer Indikator zur Durchführung einer epidemiologischen Studie ist als der Mensch, z.B. Jäger, Land- oder Forstwirt (Matile et al., 1979). Die Gründe sind vielfältig. Eine Untersuchung am Menschen ist weniger praktikabel, da Menschen, die in Endemiegebieten wohnen, häufig geimpft sind und eine Unterscheidung zwischen Infektions- und Impftiter der derzeit verwandten Vakzinen nicht möglich ist. Desweiteren wird der Meldepflicht der TBE nach Bundesseuchengesetz seitens der Humanmediziner nicht regelmässig nachgekommen (Süss et al., 2004).

Vor dem Hintergrund eines Monitoring der Endemiegebiete zur Abschätzung des tatsächlichen aktuellen Infektionsrisikos des Menschen an TBEV macht es daher Sinn, in Endemiegebieten regelmässige Untersuchungen zur Seroprävalenz von TBEV bei Pferden und Hunden durchzuführen, um ein präzises Bild von der Entwicklung des Infektionsrisikos im Endemiegebiet zu erhalten (Süss und Schrader 2004). Wie Janitza und auch Luckschander berichten, zeigen Pferde und Hunde häufig Serokonversion und haben durch ihre Haltungsweise eine hohe Zeckenexposition. Hunde zeigen nach Luckschander ein TBE-endemisches Gebiet mit grosser Sicherheit an, sind aber nicht so standorttreu wie Pferde

(Luckschander 1998). Vor allem die Gruppe der Weidepferde, die sich zu einem grossen Teil aus Zuchtstuten, Jungpferden und alten Pferden (Rentnern) zusammensetzt, ist in der Regel standorttreuer als Pferde in Boxenhaltung, die zumeist als Reit- und Sportpferde verwendet werden und in der Regel häufiger transportiert werden. Gerade in Gebieten mit einer hohen Pferdedichte eignen sich die Pferde in Weidehaltung daher besser als Hunde zur feinen Einteilung der Endemiegebiete für TBE, zum Beispiel von Hot Spots in niedrig endemischen Gebieten. Desweiteren ist die Probenentnahme bei Pferden sehr zeit- und kostengünstig durchführbar. Zur Verifizierung dieser Aussage bietet sich eine anschliessende Untersuchung von Zecken auf TBEV spezifische Nukleinsäuren an.

Gibt es Möglichkeiten Pferde vor der Infektion mit TBEV zu schützen? Als eine prophylaktische Massnahme der Wahl ist es anzustreben, die Übertragung des Erregers zu verhindern. Dies wird durch verschiedene Massnahmen erreicht, wie gezielte Auswahl zeckenarmer Weideflächen, kontinuierliches Kurzmähen von Gras, regelmässiges Absammeln der Zecken vom Pferdekörper und Auftragen von Repellents.
Gegenwärtig ist eine Impfung gegen TBE für das Pferd nicht zugelassen. In Österreich wird die Impfung von Hunden mit dem Humanimpfstoff „FSME Immun“ der Firma Baxter nach Einverständniserklärung des Besitzers praktiziert. Wäre eine Impfung von Pferden sinnvoll? Nach meiner persönlichen Einschätzung wäre es, gerade in Hinblick auf die unbefriedigenden therapeutischen Möglichkeiten im Falle einer Erkrankung, sinnvoll, exponierte Pferde in Hochrisikogebieten zu impfen, wenn ein zuverlässiger für die Spezies Pferd zugelassener Impfstoff zur Verfügung stände.

Es besteht weiterhin Forschungsbedarf für klinisch bedeutsame Fragen, u.a.:

- zum Verlauf der klinischen Erkrankung beim Pferd
- zur Dauer der Präsenz von TBEV in Blut und Liquor
- zum Verlauf des Antikörperspiegels von TBEV infizierten Pferden (IgM, IgG) in Blut und Liquor
- zur Seroprävalenz von anti-TBEV Antikörpern bei Pferden in weiteren Endemiegebieten

6. Zusammenfassung

Die TBE beim Pferd ist eine regional begrenzt auftretende Erkrankung, die noch sehr wenig erforscht und in der Tierärzteschaft weitgehend unbekannt ist. Das Ziel dieser Studie bestand darin, bei Pferden das Vorkommen von Antikörpern gegen Tick borne enzephalitis Virus (TBEV) im Endemiegebiet Marburg-Biedenkopf zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden in den Monaten Juni bis August 2003 insgesamt 240 Blutproben von Pferden in diesem Gebiet gewonnen und mittels eigens etablierter diagnostischer Verfahren getestet. Zur Etablierung eines positiven Referenzserums wurde zunächst ein Vakzinationsversuch durchgeführt, negative Kontrollseren stammten von Pferden ausserhalb bekannter Endemiegebiete. Alle Proben wurden im SNT getestet. 96 der 240 Seren wurden zusätzlich mit einem zur Untersuchung von Pferdeseren adaptierten ELISA untersucht. Ein RT-PCR-Verfahren wurde durchgeführt, um im Serum eines möglicherweise akut erkrankten Tieres TBEV nachzuweisen. Sieben Pferde (2,9%) zeigten im SNT ein positives Ergebnis, fünf dieser Pferde waren ebenfalls im ELISA positiv. Die beiden Pferde mit den niedrigsten SNT-Titern reagierten ebenso wie im SNT negative Tiere im ELISA negativ. Von sechs der im SNT seropositiven Tiere konnte im Dezember 2003 eine weitere Blutprobe gewonnen werden. Die Untersuchung dieser Verfolgsproben im SNT zeigte, dass die Titer bei vier Pferden weitgehend konstant gblieben waren, während ein Tier einen deutlichen Anstieg des anti-TBEV Titers aufwies. Die RT-PCR-Untersuchungen ergaben keinen positiven Befund.

Der Nachweis einer TBE kann durch die Bestimmung des Antikörperspiegels geführt und durch Verlaufskontrollen ergänzt werden. Obwohl vermutlich nur ein geringer Anteil (< 10%) der seropositiven Pferde tatsächlich eine klinische Manifestation der TBE entwickelt, sollte in der Tierärzteschaft gerade in TBE-Endemiegebieten bei an zentralnervösen Symptomen leidenden Tieren an die Möglichkeit einer TBEV-Infektion gedacht werden.

7. Summary

The TBE is a disease that is restricted to special endemic regions. Only limited research has been done about TBE in animals, accordingly veterinarians in Germany are in general not aware of this disease. Aim of this study was to determine the prevalence of antibodies against TBEV in the endemic region Marburg-Biedenkopf. Accordingly 240 blood samples were taken in this area between June and August 2003 which were then tested using diagnostic assays established for this purpose. To establish a positive control serum a vaccination trial was performed while negative control sera came from horses outside of known endemic regions. All serum samples were tested using an SNT; 96 out of the 240 sera were also examined in an ELISA adapted for testing horse sera. Finally a RT-PCR was performed to detect TBEV in serum from a horse suspected of acute TBE. Seven horses (2,9%) showed positive serological results by neutralisation assay, five of these animals were also positive in the ELISA. The remaining two horses with the lowest SNT titres and the SNT-negative samples were negative by ELISA. From six SNT-positive horses additional serum samples could be obtained in December 2003. The SNT results from the follow-up samples demonstrated more or less constant antibody titres in four animals. In one horse the titre had increased significantly. The RT-PCR had a negative outcome in all cases.

Diagnostic tests are concentrating on the determination of antibody titres and their course. Despite the fact that only a small number of seropositive horses (< 10%) appears to develop clinical symptoms, it is recommended that the veterinarians should consider TBE as a potential differential diagnosis in animals with central nervous disease at least in endemic regions.

8. Literaturverzeichnis

Alkadhi, H. und Kollias, S. S. (2000). "MRI in TBE." Neuroradiology **42(10)**: 753-55.

Allwinn, R., Doerr, H. W., Emmerich, P., Schmitz, H. und Preiser, W. (2002). "Cross-reactivity in flavivirus serology: new implication of an old finding?" Med Microbiol Immunol (Berl) **190(4)**: 199-202.

Anonymus (2005). "Frühsommer Meningo-enzephalitis (FSME)." Epidemiologisches Bulletin **138-148**.

Baumhackl, U. (2004). Tag des Gehirns. <http://www.nmh-wien.ac.at/gehirn/msklер2.htm>.

Baxter (2005). Zecken. <http://www.baxter.de/>.

Blastovic, D. (1958). "Epidemiologische und immunologische Probleme bei der Zeckenenzephalitis." Wien. klin. Wschr. **70**: 742-49.

Blok, I. und Gibbs, A. J. (1995). Molecular systematics of the flaviviruses and their relatives. Cambridge, England., Cambridge University Press.

Calisher, C. H. (1988). "Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis." Acta Virol. **32(5)**: 469-78.

Demichelli, V., Graves, P., Pratt, M. und Jefferson, T. (2000). "Vaccine for preventing tick-borne-encephalitis." Cochrane Database Syst Rev **65(2)**.

Dietz, O. und Huskamp, B. (1999). Encephalitiden durch Flaviviren. Stuttgart, Enke Verlag.

Gallia, F., Rampas, J. und Hollender, J. (1948). "Infezione da virus TBE." Cas Lek Ces **88**: 225-9.

Grabner, A. (1993). "Klinische Differentialdiagnose infektiös bedingter Krankheiten des ZNS beim Pferd." Collegium veterinarium **XXIV**: 27-31.

Gresikova, M., Sekeyova, M., Weidnerova, K. und Blastovic, D. (1972a). "Isolation of tick-borne encephalitis virus in the brain of a sick dog in Switzerland." Acta Virol. **16**: 88.

Gresikova, M., Weidnerova, K., Nosek, J. und Rajcani, J. (1972b). "Experimental pathogenicity of tbe virus for dogs." Acta Virol. **16**: 336-340.

Groll, E., Krausler, J., Kunz, C. und Moritsch, H. (1965). "Studies on the Morbidity and latent infection of a population in an endemic area of early summer meningoencephalitis (tick-borne encephalitis)." Arch Gesamte Virusforsch **15**: 151-8.

Han, X., Aho, M., Vene, S., Peltomaa, M., Vaheri, A. und Vapalahati, O. (2001). "Prevalence of Tick-Borne Encephalitis in Ixodes Ricinus in Finland." Journal of Medical Virology **64**: 21-28.

Heinz, F. (1996). FSME und ihre Immunprophylaxe. Schematische Darstellung eines FSME-Viruspartikels, Immuno. **1-32**.

Heinz, F. X., Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M. und Thiel, H.-J. (2000). Virus Taxonomy. Seventh Report if the Internat. Committee on Taxonomy of Viruses. M. H. V. Regenmortel van, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishopet al. San Diego, Academic Press**:** 859-78.

Hofmann, H. (1999). Hyperimmunseren zur Theraphie bei FSME. <http://www.ahc-net.at/>.

Hofmann, H., Kunz, C., Heinz, F. und Dippe, H. (1983). "Detectability of IgM antibodies against TBE virus after natural infection and after vaccination." Infection **May-Jun;11(3)**: 164-6.

Holzmann, H. (1999). Pitfalls in modern TBE-diagnosis. 5th Int. Potsdam-Symposium on Tick-borne Diseases. Potsdam, Urban Fischer Verlag, Zent.bl. Bakteriol.**:** 548-49.

Holzmann, H. (2003). "Diagnosis of tick-borne encephalitis." Vaccine **21 Suppl 1**: 36-40.

Holzmann, H., Kundi, M., Stiasny, K., Clement, J., McKenna, P. und Kunz, C. (1996). "Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis." J Med Virol **48(1)**: 102-7.

Immuno, A. (2004a). Verbreitungsgebiet der FSME-Erkrankungen in Europa. Wien, Epidem. Bulletin 21, 2004.

Immuno, A. (2004b). Verbreitungsgebiete der FSME-Erkrankungen in Deutschland. Wien, Immuno AG Wien.

Janitza, D., Hartmann, K. und Grabner, A. (2002). Serologische Untersuchung zur endemischen Situation der Infektion mit dem FSME-Virus in einer südbadischen Pferde- und Hundepopulation. II. Jahrestagung der Fachgruppe innere Medizin und Laboriumsdiagnostik/DVG.

Kaiser, R. (2002). "Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany and clinical course of the disease." Int J Med Microbiol. **291 Suppl 33**: 58-61.

Kaiser, R. und Holzmann, H. (2000). "Laboratory findings in tick-borne encephalitis--correlation with clinical outcome." Infection **28(2)**: 78-84.

Kimming, P., Hassler, D. und Braun, R. (2000). Gefahr aus Gräsern und Sträuchern; Vorbeugung und Impfung; FSME und Borreliose. München, Ehrenwirth.

Klimes, J., Jurikova, Z., Literak, I., Schanilec, P., Trachta, E. und Silva, E. (2001). "Prevalence of antibodies to tbe and West Nile flaviviruses and the clinical signs of tbe in dogs in the Czech Republic." Vet Rec **148**: 17-20.

Krausler, J., Kraus, P. und Moritsch, H. (1958). "Klinische und virologische-serologische Untersuchungsergebnisse bei FSME und anderen Virusinfektionen des ZNS im Bezirk Neunkirchen." Wien Klin Wochenschr. **70**: 634-37.

Krauss, H., Weber, A., Enders, B., Schiefer, H. G., Slenczka, W. und Zahner, H. (2004). Zoonosen - Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Köln.

Kreil, T. R., Maier, E., Fraiss, S., Attakpath, E., Burger, I. und Mannhalter, J. W. (1998). "Vaccination against TBEV, a flavivirus, prevents disease but not infection, althought viremia is not detectable." Vaccine **16(11-12)**: 1083-6.

Lammli, B., Muller, A. und Ballmer, P. E. (2000). "Late sequelae of early summer meningoencephalitis." Schweiz Med Wochenschr. **130(24)**: 909-15.

Lentze, M. J. (2003). "FSME." Monatsschrift Kinderheilkunde **151**: 1145.

Leschnik, M. W., Kirtz, G. C. und Thalhammer, J. G. (2002). "TBE in dogs." Int J Med Microbiol **291 Suppl.33**: 66-9.

Liess, B. und Kaaden, O. R. (2003). Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Hannover, Schlütersche.

Lindenbach, B. D., Rice, M. und Burke, D. S. (2001). Fields Virology. Philadelphia, Raven Publishers.

Luckschander, N. (1998). Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) in einer österreichischen Pferdepopulation. I Med Univ.klinik für Einhufer und Kleintiere. Wien, University of Vienna.

Lukassowitz, I. (2003). FSME. http://www.bfr.bund.de/.

Matile, H., Aeschlimann, A. und Wyler, R. (1979). Seroepidemiologic investigations on the incidence of TBE in man and dog in Switzerland. Wien, Facultas.

Mehlhorn, H. und Mehlhorn, B. (1996). Zecken. Berlin, Springer Verlag.

Metha, C. und Patel, N. (1993). LogXact, User manual. Cambridge MA.

Müller, W. (1997). TBE in the dog: seroepidemiological studies. 4th International Symposium on Tick-borne Diseases, Potsdam, Pabst Science Publishers.

Özdemir, F. A., Rosenow, F., Slenczka, W., Kleine, T. O. und Oertel, W. H. (1999). "Early summer meningoencephalitis. Extension of the endemic area to mid-Hessia." Nervenarzt. **70(2)**: 119-22.

Paul, J. (1970). Cell and Tissue Culture, Livingstone, Edinburgh.

Petrausch, R. (2003). Lila Liste Remedia ad us. vet. Berlin.

Reiner, B. und Fischer, A. (1998). "Zentraleuropäische Zeckenenzephalitis beim Hund." Kleintierpraxis **38**: 619-628.

Reiner, B., Fischer, A., Gödde, T. und Müller, W. (1999). Clincal diagnosis of canine TBE: Contribution of CSF analysis and CSF antibody titers. 5th International Symposium on Tick-borne Diseases, Potsdam.

Rick, W. (1990). Klinische Chemie und Mikroskopie, Springer, Berlin/Heidelberg.

Rieger, M. A., Nübling, M., Huwer, M., Müller, W. und Hofmann, F. (1997). "Untersuchungen zur Epidemiologie der FSME: Nehmen Rinder am Zyklus der Virusübertragung im südwestdeutschen Endemiegebiet teil?" Mitteilung Immun.Infekt. **2**: 52-57.

RKI (2003). Definitionen für Risiko-, Hochrisiko- und Endemiegebiete der TBE. Epidemiolog. Bulletin 21.

RKI (2005). "Definitionen für Risiko-, Hochrisiko- und Endemiegebiete der TBE." Epidem. Bulletin **16/05**.

Rolle, M. und Mayr, A. (2001). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag.

Schneider, H. (1931). "Ueber epidemische akute Meningitis serosa." Wien. klin. Wschr. **44**: 350-352.

Süss, J., Beziat, P., Ramelow, C. und Kahl, O. (1997). "Tick-borne encephalitis virus (TBEV)-specific RT-PCR for characterization of natural foci of TBE and for other applications." Zentralbl Bakteriol. **286(1)**: 125-38.

Süss, J., Beziat, P., Rohr, H. P., Treib, J. und Haass, A. (1996). "Detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in several federal "Lander" of Germany by means of the polymerase chain reaction (PCR)--characterization of the virus." Infection. **24(5)**: 403-4.

Süss, J. und Schrader, C. (2004). "Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered nonpathogenic. Part I: Ticks and Viruses." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2004 **47(4)**: 392-404.

Süss, J., Schrader, C., Falk, U. und Wohanka, N. (2004). "Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany--epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans." Int J Med Microbiol. **293 Suppl 37**: 69-79.

Tipold, A., Fatzer, R. und Holzmann, H. (1993). "Zentraleuropäische Zeckenenzephalitis beim Hund." Kleintierpraxis **38**: 619-28.

Tipold, A. und Jaggy, A. (1993). "What is your diagnosis? Sterile, suppurating meningitis." Schweiz Arch Tierheilkd. **135(10)**: 317-20.

Waldvogel, A., Matile, H., Wegmann, C., Wyler, R. und Kunz, C. (1981). "Zeckenenzephalitis beim Pferd." Schweiz. Arch. Tierheilk. **123**: 227-233.

Waldvogel, K., Bossart, W., Huisman, T., Boltshauser, E. und Nadal, D. (1996). "Severe tick-borne encephalitis following passive immunization." Eur J Pediatr **155**: 775-9.

Wandeler, A., Steck, F., Fankhauser, R., Kammermann, B., Gresikova, M. und Blascovic, D. (1972). "Isolierung des Virus der zentraleuropäischen Zeckenenzephalitis in der Schweiz." Pathol. Microbiol. **38**: 258-270.

Weissenböck, H. und Holzmann, H. (1997). "Immunhistologischer Nachweis der Frühsommer-Meningoencephalitis beim Hund in Österreich." Wien. Tierärztl. Monatsschr. **84**: 34-38.

Woessner, R., Muhl, A., von Arnim, W. H. und Treib, J. (2001). "Autochthonous cases of tick-borne encephalitis in Rhineland-Palatinate." Nervenarzt. **72(2)**: 147-9.

9. Anhang

9.1. Protokollblatt RT-PCR

PCR Datum:

	Proben ID	Material	Ergebnis		Proben ID	Material	Ergebnis
1				14			
2				15			
3				16			
4				17			
5				18			
6				19			
7				20			
8				21			
9				22			
10				23			
11				24			
12				25			
13				26			

(NK – negative Kontrolle; PK – positive Kontrolle)

Zahl der Reaktionsansätze (Faktor n):

RNA Präparation:

RNeasy Kit Lot.-Nr.:

QIAmp Kit Lot.Nr.:

Startmix:

0.5µl x *n* Primer TBE-2	
7.5 µl x *n* Aq dd	

9.0µl x *n*

> je Reaktionsansatz 9µl Startmix in 0.2ml Probengefäße pipettieren; 2.5 µl präparierte Test bzw Kontroll-RNS zugeben

> denaturieren: 94°C 3 Min.; abkühlen auf 4°C

RT-Mix:

8.0µl x *n* Puffer VIIIa	
0.25µl x *n* RNAse Inhibitor	
0.25µl x *n* reverse Transkriptase	

8.5µl x *n*

> je Reaktionsansatz 8.5µl RT-Mix zugeben; Inkubation: 30 Min. 45°C, abkühlen auf 4°C

PCR-Mix:

10.0µl x *n* Puffer VIIIb	
0.5 µl x n TBE-1	
19.3µl x *n* Aq dd	
0.2µl x *n* Polymerase	

30µl x *n*

> je Reaktionsansatz 30µl pipettieren

> Amplifikationsbedingungen: Denaturierung 94°C 30 Sek.; Annealing 55°C 20 Sek.; Elongation 72°C 30 Sek.; Zyklen 30x; abkühlen auf 4°C

Nested-PCR Mix:

0.5µl x *n* Primer TBE-3	
0.5µl x *n* Primer TBE-4	
8.0µl x *n* Puffer VIIIa	
10.0µl x *n* Puffer VIIIb	
0.2µl x *n* Polymerase	
28.3µl x *n* Aq dd	

47.5µl x *n*

> je Reaktionsansatz 47.5µl nested-PCR Mix in 0.2ml Reaktionsgefäße pipettieren

> jeweils 2.5µl aus den RT-PCR Ansätzen zugeben

> Amplifikationsbedingungen: Denaturierung 94°C 20 Sek.; Annealing 55°C 20 Sek.; Elongation 72°C 30 Sek.; Zyklen 30x; abkühlen auf 4°C

> je Reaktionsansatz 8µl + 2µl Ladepuffer auf ein 1.5% Agarosegel laden

Elektrophorese: 35 Min. bei 100V

9.2. Protokoll Trypanblauexklusionstest

Der Trypanblauexklusionstest wird durchgeführt nach Rick (Rick 1990) und Paul (Paul 1970). Folgenden Materialien wurden verwendet:
Zellsuspension: Kulturzellen in Gewebekulturmedium mit/ohne FBS, Medien und Puffer.
Trypanblaulösung: 0,25% (w/v) Trypanblau (Serva 37252), 0,15 M NaCl; die Lösung wird sterilfiltriert (0,2µm Porenweite) und bei 4°C geklagert (Lösungen mit Farbstoffpräzipitaten werden verworfen).
Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal, 96well Rundbodenplatte, Präzisionspipetten, Pipettenspitzen (steril), inverses Lichtmikroskop (Vergr. 20x/10x).

Da die Zellsuspension i.d.R. für virologische Untersuchungsverfahren eingesetzt werden soll, muß unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden (Sicherheitswerkbank Klasse II, sterile Pipettenspitzen). Die allgemeinen Bestimmungen beim Umgang mit infektiösem Material sind einzuhalten.
Zur Vorbereitung der Zellsuspension werden die Zellen z.B. durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung in Suspension gebracht; dabei ist auf eine möglichst vollständige Vereinzelung der Zellen zu achten. In eine Vertiefung einer 96well Rundbodenplatte werden 180µl Trypanblaulösung vorgelegt. Die Zellsuspension wird durch Pipettieren homogenisiert und mit einer sterilen Einmalpipettenspitze 20µl in die Trypanblaulösung überführt. Die Zellsuspension/Trypanblaulösung wird mit einer frischen Pipettenspitze durchmischt und für etwa 5 Min. inkubiert.

Zur Vorbereitung auf die Zellzählung wird die Zählkammer aus der Aufbewahrungsflüssigkeit (70% Ethanol (v/v)) genommen und gründlich abgetrocknet. Die zur Befestigung des Deckglases vorgesehenen plan geschliffenen Flächen der Zählkammer werden leicht angefeuchtet und das geschliffene Deckglas von der Seite her so aufgeschoben, dass auf beiden Auflageflächen Newton'sche Ringe sichtbar sind.
Die Zellsuspension/Trypanblaulösung wird mit einer 200µl Präzisionspipette mehrfach durchmischt. Die gefüllte Pipettenspitze wird dicht am den Rand des Deckgläschens schräg auf den Boden der Zählkammer aufgesetzt. Die Suspension wird vorsichtig in die Zählkammer pipettiert bis diese bis zum Rand gefüllt ist. Vor dem Zählen sollen die Zellen 1 – 2 Min. Gelegenheit zur Sedimentation haben.
Die Zählung der Zellen erfolgt unter einem Lichtmikroskop mit inversem Strahlengang bei einer Vergrößerung von 100x. Ausgezählt werden 4 Großquadrate in einer Diagonalen der Kammer (entspr. 16 Kleinquadrate). Berücksichtigt werden alle lebenden d.h. gelblich erscheinenden, morphologisch intakten Zellen innerhalb der zu zählenden Großquadrate

einschließlich der Zellen, welche die linke und die untere Mittellinie der Begrenzung berühren (L-förmige Zählung). Die je Großquadrat gezählte Zellzahl wird notiert und abschließend die Summe gebildet. Wurden weniger als 20 oder mehr als 100 Zellen je Großquadrat gezählt, so ist der Verdünnungsfaktor der Zellsuspension neu einzustellen und die Zählung zu wiederholen. Liegen mehr als 10% der Zellen in Zellhaufen vor, so ist die Zählung ebenfalls zu wiederholen. Der Anteil nicht lebensfähiger (blau angefärbter) Zellen wird geschätzt und notiert.

Berechnung der Zellzahl
Das Volumen über dem Zählfeld einer Fuchs-Rosenthal-Kammer beträgt 3,2µl (4mm x 4mm x 0.2mm). Die Zellzahl wird daher wie folgt berechnet:

$$n \times 4 \times V \times \frac{1000}{3{,}2} = Zellen / ml$$
$$n \times V \times 1250 = Zellen / ml$$

n = Zellen in 4 Großquadraten, V = Verdünnungsfaktor (i.d.R. 1:10)

9.3. Rohdaten

Die ID-Nummern, welche im Ergebnis- und Diskussionsteil mit ID 1 bis 8 benannt werden, entsprechen folgenden ID-Nummern in den Rohdaten:

ID Ergebnis- und Diskussionsteil	ID Rohdaten
ID 1	ID 84
ID 2	ID 48
ID 3	ID 117
ID 4	ID 140
ID 5	ID 169
ID 6	ID 80
ID 7	ID 143
ID 8	ID 230 „Rinaldo“

9.3.1. Daten SNT

Rohdatenbezogenes Abkürzungsverzeichnis:

ID= Identifikationsnummer

ISTS= Positives Referenzserum

NS= Negatives Referenzserum

MW= Mittelwert

MW+2s= Mittelwert plus zweifache Standardabweichung

MW-2s= Mittelwert minus zweifache Standardabweichung

SAW= Standardabweichung

TS= Testserum

V= Variationskoeffizient

VGV= Virusgebrauchsverdünnung

WDH= Wiederholungsproben

H	G	F	E	D	C	B	A	
ZK							VGV	1
ZK							VGV	2
ZK							VGV	3
ZK							VGV	4
						ISTS		5
						ISTS		6
						NS		7
						NS		8
						TS1	TS1	9
						TS1	TS1	10
						TS2	TS2	11
						TS2	TS2	12

Abbildung 14: Belegung der SNT-Testplatten (Testplatte 1 einer Serie mit Kontrollseren)

	VGV	ISTS	NS
MW	1,9225	2,29625	0,24
SAW	0,356320482	0,333720906	0
V	18,53	14,53	0
MW+2s	2,635140963	2,963691811	0,24
MW-2s	1,209859037	1,628808189	0,24

VGV	ISTS	NS	Datum Test
2,11	2,62	0,24	27.10.2003
1,51	2,39	0,24	30.10.2003
1,51	2,15	0,24	06.11.2003
1,51	1,67	0,24	12.11.2003
2,11	2,15	0,24	13.11.2003
2,11	2,62	0,24	25.11.2003
2,41	2,62	0,24	26.11.2003
2,11	2,15	0,24	07.12.2003

	27.10.2003		
ID		Titer (1:n)	Titer $\log_{10}ND_{50}$
	VGV	47	2,11
	ISTS	420,89	2,62
	NS	1,73	0,24
1	TS 1	1,73	0,24
2	TS 2	1,73	0,24
3	TS 3	1,73	0,24
4	TS 4	1,73	0,24
5	TS 5	1,73	0,24
6	TS 6	1,73	0,24
7	TS 7	1,73	0,24
8	TS 8	1,73	0,24

	30.10.2003		
ID		Titer (1:n)	Titer $\log_{10}ND_{50}$

	VGV	32	1,51
	ISTS	243	2,39
	NS	1,73	0,24
9	TS 1	1,73	0,24
10	TS 2	1,73	0,24
11	TS 3	1,73	0,24
12	TS 4	1,73	0,24
13	TS 5	1,73	0,24
14	TS 6	1,73	0,24
15	TS 7	1,73	0,24
16	TS 8	1,73	0,24
17	TS 9	1,73	0,24
18	TS 10	1,73	0,24
19	TS 11	1,73	0,24
20	TS 12	1,73	0,24
21	TS 13	1,73	0,24
22	TS 14	1,73	0,24
23	TS 15	1,73	0,24
24	TS 16	1,73	0,24
25	TS 17	1,73	0,24
26	TS 18	1,73	0,24
27	TS 19	1,73	0,24
28	TS 20	1,73	0,24
29	TS 21	1,73	0,24
30	TS 22	1,73	0,24
31	TS 23	1,73	0,24
32	TS 24	1,73	0,24
33	TS 25	1,73	0,24
34	TS 26	1,73	0,24
35	TS 27	1,73	0,24
36	TS 28	1,73	0,24
37	TS 29	1,73	0,24
38	TS 30	1,73	0,24
39	TS 31	1,73	0,24
40	TS 32	1,73	0,24
41	TS 33	1,73	0,24
42	TS 34	1,73	0,24
43	TS 35	1,73	0,24

44	TS 36	1,73	0,24
45	TS 37	1,73	0,24
46	TS 38	1,73	0,24
47	TS 39	1,73	0,24
48	TS 40	243	2,39
49	TS 41	1,73	0,24
50	TS 42	1,73	0,24
51	TS 43	1,73	0,24
52	TS 44	1,73	0,24
53	TS 45	1,73	0,24
54	TS 46	1,73	0,24
55	TS 47	1,73	0,24
56	TS 48	1,73	0,24

	06.11.2003		
ID		Titer (1:n)	Titer $log_{10}ND_{50}$
	VGV	32	1,51
	ISTS	140,3	2,15
	NS	1,73	0,24
57	TS 1	1,73	0,24
58	TS 2	1,73	0,24
59	TS 3	1,73	0,24
60	TS 4	1,73	0,24
61	TS 5	1,73	0,24
62	TS 6	1,73	0,24
63	TS 7	1,73	0,24
64	TS 8	1,73	0,24
65	TS 9	1,73	0,24
66	TS 10	1,73	0,24
67	TS 11	1,73	0,24
68	TS 12	1,73	0,24
69	TS 13	1,73	0,24
70	TS 14	1,73	0,24
71	TS 15	1,73	0,24
72	TS 16	1,73	0,24
73	TS 17	1,73	0,24
74	TS 18	1,73	0,24

75	TS 19	1,73	0,24
76	TS 20	1,73	0,24
77	TS 21	1,73	0,24
78	TS 22	1,73	0,24
79	TS 23	1,73	0,24
80	TS 24	5,2	0,72
81	TS 25	1,73	0,24
82	TS 26	1,73	0,24
83	TS 27	1,73	0,24
84	TS 28	15,59	1,19
85	TS 29	1,73	0,24
86	TS 30	1,73	0,24
87	TS 31	1,73	0,24
88	TS 32	1,73	0,24
89	TS 33	1,73	0,24
90	TS 34	1,73	0,24
91	TS 35	1,73	0,24
92	TS 36	1,73	0,24
93	TS 37	1,73	0,24
94	TS 38	1,73	0,24
95	TS 39	1,73	0,24
96	TS 40	1,73	0,24
97	TS 41	1,73	0,24
98	TS 42	1,73	0,24
99	TS 43	1,73	0,24
100	TS 44	1,73	0,24
101	TS 45	1,73	0,24
102	TS 46	1,73	0,24
103	TS 47	1,73	0,24

	12.11.2003		
ID		Titer (1:n)	Titer $\log_{10}ND_{50}$
	VGV	32	1,51
	ISTS	46,77	1,67
	NS	1,73	0,24
104	TS 3	1,73	0,24
105	TS 4	1,73	0,24

106	TS 5	1,73	0,24
107	TS 6	1,73	0,24
108	TS 7	1,73	0,24
109	TS 8	1,73	0,24
110	TS 9	1,73	0,24
111	TS 10	1,73	0,24
112	TS 11	1,73	0,24
113	TS 12	1,73	0,24
114	TS 13	1,73	0,24
115	TS 14	1,73	0,24
116	TS 15	1,73	0,24
117	TS 16	5,2	0,72
118	TS 17	1,73	0,24
119	TS 18	1,73	0,24
120	TS 19	1,73	0,24
121	TS 20	1,73	0,24
122	TS 21	1,73	0,24
123	TS 22	1,73	0,24
124	TS 23	1,73	0,24
125	TS 24	1,73	0,24
126	TS 25	1,73	0,24
	WDH		
84	TS 1	46,77	1,67
48	TS 2	46,77	1,67

	13.11.2003		
ID		Titer (1:n)	Titer $\log_{10}ND_{50}$
	VGV	128	2,11
	ISTS	140,3	2,15
	NS	1,73	0,24
127	TS 1	1,73	0,24
128	TS 2	1,73	0,24
129	TS 3	1,73	0,24
130	TS 4	1,73	0,24
131	TS 5	1,73	0,24
132	TS 6	1,73	0,24
133	TS 7	1,73	0,24

134	TS 8	1,73	0,24
135	TS 9	1,73	0,24
136	TS 10	1,73	0,24
137	TS 11	1,73	0,24
138	TS 12	1,73	0,24
139	TS 13	1,73	0,24
140	TS 14	46,77	1,67
141	TS 15	1,73	0,24
142	TS 16	1,73	0,24
143	TS 17	243	2,39
144	TS 18	1,73	0,24
145	TS 19	1,73	0,24
146	TS 20	1,73	0,24
147	TS 21	1,73	0,24
148	TS 22	1,73	0,24
149	TS 23	1,73	0,24
150	TS 24	1,73	0,24
151	TS 25	1,73	0,24
152	TS 26	1,73	0,24
153	TS 27	1,73	0,24
154	TS 28	1,73	0,24
155	TS 29	1,73	0,24
156	TS 30	1,73	0,24
157	TS 31	1,73	0,24
158	TS 32	1,73	0,24
159	TS 33	1,73	0,24
160	TS 34	1,73	0,24
161	TS 35	1,73	0,24
162	TS 36	1,73	0,24
163	TS 37	1,73	0,24
164	TS 38	1,73	0,24
165	TS 39	1,73	0,24
166	TS 40	1,73	0,24
167	TS 41	1,73	0,24
168	TS 42	1,73	0,24
169	TS 43	5,2	0,72
170	TS 44	1,73	0,24
171	TS 45	1,73	0,24

172	TS 46	1,73	0,24
173	TS 47	1,73	0,24

25.11.2003

ID		Titer (1:n)	Titer $log_{10}ND_{50}$
	VGV	128	2,11
	ISTS	420,89	2,62
	NS	1,73	0,24
174	TS 1	1,73	0,24
175	TS 2	1,73	0,24
176	TS 3	1,73	0,24
177	TS 4	1,73	0,24
178	TS 5	1,73	0,24
179	TS 6	1,73	0,24
180	TS 7	1,73	0,24
181	TS 8	1,73	0,24
182	TS 9	1,73	0,24
183	TS 10	1,73	0,24
184	TS 11	1,73	0,24
185	TS 12	1,73	0,24
186	TS 13	1,73	0,24
187	TS 14	1,73	0,24
188	TS 15	1,73	0,24
189	TS 16	1,73	0,24
190	TS 17	1,73	0,24
191	TS 18	1,73	0,24
192	TS 19	1,73	0,24
193	TS 20	1,73	0,24
194	TS 21	1,73	0,24
195	TS 22	1,73	0,24
196	TS 23	1,73	0,24
197	TS 24	1,73	0,24
198	TS 25	1,73	0,24
199	TS 26	1,73	0,24
200	TS 27	1,73	0,24
201	TS 28	1,73	0,24
202	TS 29	1,73	0,24

203	TS 30	1,73	0,24
204	TS 31	1,73	0,24
205	TS 32	1,73	0,24
206	TS 33	1,73	0,24

26.11.2003

ID		Titer (1:n)	Titer $log_{10}ND_{50}$
	VGV	256	2,41
	ISTS	420,89	2,62
	NS	1,73	0,24
207	TS 1	1,73	0,24
208	TS 2	1,73	0,24
209	TS 3	1,73	0,24
210	TS 4	1,73	0,24
211	TS 5	1,73	0,24
212	TS 6	1,73	0,24
213	TS 7	1,73	0,24
214	TS 8	1,73	0,24
215	TS 9	1,73	0,24
216	TS 10	1,73	0,24
217	TS 11	1,73	0,24
218	TS 12	1,73	0,24
219	TS 13	1,73	0,24
220	TS 14	1,73	0,24
221	TS 15	1,73	0,24
222	TS 16	1,73	0,24
223	TS 17	1,73	0,24
224	TS 18	1,73	0,24
225	TS 19	1,73	0,24
226	TS 20	1,73	0,24
227	TS 21	1,73	0,24
228	TS 22	1,73	0,24
229	TS 23	1,73	0,24
230	TS 24	81	1,91
231	TS 25	1,73	0,24
232	TS 26	1,73	0,24
233	TS 27	1,73	0,24

234	TS 28	1,73	0,24
235	TS 29	1,73	0,24
236	TS 30	1,73	0,24
237	TS 31	1,73	0,24
238	TS 32	1,73	0,24
239	TS 33	1,73	0,24
240	TS 34	1,73	0,24
241	TS 35	1,73	0,24

	WDH		
117	TS 24	81	1,91
140	TS 25	27	1,43
169	TS 26	3	0,48

Verlaufsproben
17.12.03

ID		Titer (1:n)	Titer $log_{10}ND_{50}$
	VGV	128	2,11
	ISTS	140,3	2,15
	NS	1,73	0,24
48	TS 1	81	1,91
84	TS 2	243	2,39
80	TS 3	1,73	0,24
117	TS 4	46,77	1,67
140	TS 5	27	1,43
169	TS 6	5,2	0,72
173	TS 7	1,73	0,24
230	TS 8	81	1,91
231	TS 9	27	1,43
232	TS 10	15,59	1,19
233	TS 11	46,77	1,67
234	TS 12	140,3	2,15
143	TS 13	140,3	2,15

9.3.2. Daten ELISA

Die Readerwerte werden zusätzlich angegeben in Prozent bezogen auf die Positivkontrolle des jeweiligen Tests.

	ELISA K2030812		
ID	**Name**	**Readerwerte**	**%Positivkontrolle**
	Positives Kontrollserum	0,574	
	Negatives Kontrollserum	0,078	
84	Rb9	0,664	118,15
48	N9	0,661	117,54
117	ElmshM	0,406	66,13
142	Ulf1	0,072	-1,21
169	Wwal	0,076	-0,4
140	BobbyWh	0,551	95,36
16	8Camee	0,112	6,85
80	Rb5	0,097	3,83
81	Rb6	0,078	0
82	Rb7	0,047	-6,25
83	Rb8	0,084	1,21
240	Serum Bodensee	0,131	10,69
85	Rb10	0,045	-6,65
86	Rb11	0,054	-4,84
87	Rb12	0,101	4,64
143	SPUlf2	0,463	77,62
144	Ulf3	0,096	3,63
185	WHZambesi	0,07	-1,61
186	WHRiva	0,037	-8,27
183	WHNurmi	0,143	13,1
187	WHDanista	0,117	7,86
184	WHWildrose	0,045	-6,65

	ELISA KM030912		
ID	**Name**	**Readerwerte**	**%Positivkontrolle**
	Positives Kontrollserum	0,737	
	Negatives Kontrollserum	0,101	
70	HH1	0,079	-3,46
71	HH2	0,155	8,49
72	HH3	0,179	12,26
73	HH4	0,147	7,23
74	HH5	0,111	1,57
75	HH6	0,093	-1,26
76	HH7	0,099	-0,31
77	HH8	0,223	19,18
78	HH9	0,113	1,89
79	HH10	0,116	2,36
110	Ldanista	0,21	17,14
111	Lpretty	0,188	13,68
112	Llord	0,151	7,86
113	Llady	0,075	-4,09
114	Lbacardi	0,099	-0,31
162	Fronh6Babuschka	0,138	5,82

163	Fronh5Sunny	0,219	18,55
158	WH1Chick	0,185	13,21
159	WH3Gipsy	0,059	-6,6
160	WH4Bajard	0,057	-6,92
161	WH2Fjölnir	0,054	-7,39
95	Kläuschen1.SG	0,115	2,2

ELISA KM031012

ID	**Name**	**Readerwerte**	**%Positivkontrolle**
	Positives Kontrollserum	0,708	
	Negatives Kontrollserum	0,088	
57	SS1	0,111	3,71
58	SS2	0,116	4,52
59	SS3	0,155	10,81
60	SS4	0,104	2,58
61	SS5	0,06	-4,52
62	SS6	0,114	4,19
63	SS7	0,113	4,03
64	SS8	0,142	8,71
65	SS9	0,052	-5,81
66	SS10	0,19	16,45
67	SS11	0,048	-6,45
68	SS12	0,085	-0,48
69	SS13	0,091	0,48
88	Sth1	0,085	-0,48
89	Sth2	0,177	14,35
90	Sth3	0,154	10,65
91	Sth4	0,061	-4,35
92	Sth5	0,083	-0,81

ELISA KM031512

ID	**Name**	**Readerwerte**	**%Positivkontrolle**
	Positives Kontrollserum	0,503	
	Negatives Kontrollserum	0,083	
9	RHH1	0,065	-4,29
10	RHH2	0,059	-5,71
11	RHH3	0,082	-0,24
12	RHH4	0,093	2,38
13	RHH5	0,111	6,67
14	RHH6	0,087	0,95
15	RHH7	0,167	20
17	RHH9	0,084	0,24
18	RHH10	0,057	-6,19
19	RHH11	0,103	4,76
20	RHH12	0,1	4,05
21	RHH13	0,106	5,48
22	RHH14	0,116	7,86
23	RHH15	0,127	10,48
24	Hachb1	0,08	-0,71
25	Hachb2	0,134	12,14
26	Hachb3	0,132	11,67
27	Hachb4	0,118	8,33
225	Schönb1	0,096	3,1
226	Schönb2	0,077	-1,43

227	Schönb3	0,1	4,05
174	RauschbDalesko	0,155	17,14

ELISA K2031512

ID	**Name**	**Readerwerte**	**%Positivkontrolle**
	Positives Kontrollserum	0,379	
	Negatives Kontrollserum	0,066	
164	WetterIris	0,044	-7,03
165	Wmaurice	0,126	19,17
166	Wwaldfee	0,08	4,47
167	Wmara	0,079	4,15
168	Wdoro	0,099	10,54
170	Wnino	0,064	-0,64
171	Wfontane	0,047	-6,07
172	Wzox	0,136	22,36
173	Wfreshman	0,117	16,29
40	NeustadtJonie	0,066	0
41	Nsimon	0,063	-0,96
42	Ndenny	0,089	7,35
43	Nsico	0,069	0,96
44	Nbigot	0,085	6,07
45	Npolo	0,117	16,29
46	Ntanja	0,057	-2,88
47	Nsahira	0,086	6,39
49	Nbobby	0,079	4,15
50	Ncindy	0,082	5,11
32	SthSunr	0,087	6,71
33	Sthlennox	0,054	-3,83
104	Niederweim11	0,031	-11,18

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäss aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5065-7

9 783835 950658